

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos**



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS
BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO :
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA Y
PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS G14 Y
G15 DE *LACTOBACILLUS CURVATUS* BCS35**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Beatriz Gómez Sala

Bajo la dirección de los doctores

Luis M. Cintas Izarra
Pablo E. Hernández Cruza
Carmen Herranz Sorribes

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS
BACTERIOCINOGENICAS DE ORIGEN MARINO.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS
G14 Y G15 DE *Lactobacillus curvatus* BCS35**

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ GÓMEZ SALA

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS
BACTERIOCINOGENICAS DE ORIGEN MARINO.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS
G14 Y G15 DE *Lactobacillus curvatus* BCS35**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica
de “Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada
Beatriz Gómez Sala

Madrid, marzo de 2013



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

LUIS M. CINTAS IZARRA, PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA Y CARMEN HERRANZ SORRIBES, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que, la Tesis Doctoral titulada **“Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino. Caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35”**, de la que es autora la Licenciada en Farmacia Dña. Beatriz Gómez Sala, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Y, para que surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a uno de marzo de dos mil trece

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Pablo E. Hernández Cruza

Carmen Herranz Sorribes

A mis padres, Paco y Ana

A mis hermanos, Pablo, Álvaro y Gonzalo

A mi tía Carmen y a mi abuela Ana

*Hay un momento en que el astrónomo, debajo del gran telescopio, se convierte en microbio de la
luna que se asoma a observarlo
Ramón Gómez de la Serna (1888-1963)*

*The capacity to blunder slightly is the real marvel of DNA. Without this special attribute, we would
still be anaerobic bacteria and there would be no music
Lewis Thomas (1913-1993)*

*No entertainment is so cheap as reading, nor any pleasure so lasting
Lady Mary Wortley Montagu (1689-1762)*

*Do not fear to be eccentric in opinion, for every opinion now accepted was once eccentric
Bertrand Russell (1872-1970)*

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han permitido, participado o contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como a todas aquéllas a las que he tenido la oportunidad de conocer durante los años dedicados a este trabajo de investigación, con las que he compartido incontables e inolvidables momentos.

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el período de realización de este trabajo de investigación, Lorenzo de la Hoz Perales, y María Dolores Selgas Cortecero, por aceptarme en este Departamento y por la amabilidad mostrada en todo momento.

Me gustaría expresar mi gratitud de manera muy especial a mis directores de tesis, Luis M. Cintas Izarra, Pablo E. Hernández Cruza y Carmen Herranz Sorribes, por haberme aceptado en su grupo de investigación, por confiar en mí desde el primer momento y por la ayuda que me han ofrecido durante la realización de este trabajo. A Luis M. Cintas Izarra, director y tutor de esta Tesis Doctoral, por su dedicación y sus brillantes e inagotables ideas. Muchas gracias Luis, por ser un maestro para mí, por tu inestimable ayuda y apoyo, no sólo durante este trabajo sino en todos los demás proyectos en los que hemos colaborado, por el entusiasmo y el interés mostrado en todo momento y por toda la ayuda que me has brindado siempre. Sin tu trabajo y dedicación, la realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible. A Pablo, por su tiempo y constante disponibilidad, por los sabios consejos recibidos introduciéndome así en el apasionante mundo de la investigación y por hacerme sentir una integrante más de su grupo de investigación. A Carmen, por tu ayuda y dedicación en las últimas etapas de esta Tesis, por todas tus aportaciones dentro y fuera del laboratorio y por tu constante disponibilidad para resolver cualquier duda.

A todos los demás miembros del Departamento, tanto profesores y PAS como estudiantes de doctorado y máster, que han compartido conmigo todo este tiempo, por su amabilidad y constante disponibilidad, especialmente a Charo, por ser siempre tan cariñosa conmigo y por sus sabias palabras en momentos importantes, y a Fernanda, por todas las charlas y buenos consejos en la planta baja del Departamento.

A todos mis compañeros del laboratorio “punto LAB”, especialmente a Jorge y Antonio, compañeros de trabajo desde los comienzos de esta tesis doctoral, con los que he compartido grandes y memorables momentos. Gracias a los dos por vuestra continua y desinteresada ayuda, por las interesantes y divertidas conversaciones a última hora del día, por estar siempre que os he necesitado, incluso para tareas menos científicas pero igualmente importantes como quitarme los puntos de la espalda, como si de cualquier otro animal en vuestras prácticas veterinarias se tratara. Me siento afortunada de haberos conocido y haber compartido con vosotros todo este tiempo. Sin vosotros no hubiera sido lo mismo, y el tiempo nos está demostrando que la amistad forjada es sólida y duradera. A María, por el tiempo y dedicación dentro del laboratorio, y la amistad fuera de él. Por todas las meriendas en VIPS, las tardes de piscina y las risas y lágrimas compartidas. Gracias por todo María, ha sido y sigue siendo un placer tenerte cerca. A los

antiguos, Rosanna, Raquel y Jorge Gutiérrez, por todo el conocimiento transmitido y los consejos al comienzo de este trabajo. A los más nuevos con los que he compartido también muy buenos momentos. A Loreto, por tu complicidad, tu alegría, tu generosidad y las interesantes y divertidas charlas dentro y fuera del laboratorio; espero que esta amistad dure mucho tiempo. A Juan, por los experimentos compartidos, especialmente la parte de los conejos, nunca olvidaré a J9. A la nueva generación Estefanía, Cristina, Carlos, Juanjo y Sara por vuestra simpatía y amabilidad cada vez que voy de visita al Departamento. Quisiera agradecerle especialmente a Estefanía los meses compartidos en Vigo. Me ha gustado mucho convivir contigo y poder compartir tanto las preocupaciones laborales como las personales, y espero que volvamos a coincidir en el futuro.

Me gustaría agradecer al resto de becarios del Departamento, especialmente a las “del fondo” y a los de “al lado”, por su ayuda prestada todos estos años, así como por crear un buen ambiente en el que era fácil convivir e incluso llegar a divertirse mientras realizabas los experimentos y preparabas las prácticas para los alumnos. Especialmente quisiera agradecerle a aquéllos con los que más he convivido. A Belén, por los interminables días de prácticas y los divertidos cafés de los descansos, a Violeta por su inagotable alegría, y a Inés, Nuria, Almudena, Eugenia, Irene y Miguel Ángel por el tiempo compartido. A Rocío, Esther, Antonio Maldonado, Marta, Rebeca, Susana y Virginia por el apoyo y la ayuda siempre que era necesario y por los buenos momentos vividos fuera del laboratorio. También quiero agradecer a Rosi las agradables charlas sobre nuestra tierra en el pasillo, además de hacer del Departamento un entorno mucho más agradable en el que trabajar, y a Aurora, Santiago y Alberto por la amabilidad siempre mostrada.

I would like to thank to Ingolf F. Nes for accepting me in his research laboratory (*Laboratory of Microbial Gene Technology, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Noruega*) and for always trying to make my stay the most enjoyable. To Ingolf and Dzung B. Diep for supervising my research work during my stay, for their teachings, and for the help given at every moment. Thank you to Zhian, Brede, Linda, Helge, and to everybody in LMQ. Tusen tak!

A todos mis compañeros de Innaves, Belén, Mónica, Montse, Cris, Moncho y Fran, por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado, por vuestra fuerza y empuje en los momentos difíciles y el inestimable valor humano que aportáis todos y cada uno de los días de trabajo. Es un placer y un honor trabajar con todos vosotros.

Asimismo, quisiera agradecer a todas las instituciones públicas y privadas que han concedido financiación a nuestro grupo y a Innaves S.A. durante el tiempo en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral. A este respecto, el trabajo realizado ha sido posible gracias a los proyectos de investigación concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia (Proyectos AGL2003 01508 y AGL2006 01042), el Ministerio Ciencia e Innovación (Proyecto HP2008-0070), la Comunidad de Madrid (Proyectos S 0505/AGR/0265, GR85/06 y CCG07-UCM/AGR-2546), la Xunta de

Galicia (Proyectos PGIDITO2BTFO3E, PGIDITO3BTFO3E y PGIDITO5TALO37E) y el Banco Santander-Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid (Proyecto GR58/O8).

A la investigadora Dra. Isidra Recio y todo su grupo, por la ayuda prestada en todo momento, y el apoyo personal recibido siempre.

A mis amigas de toda la vida, con las que he compartido tantas cosas y tantas etapas decisivas, y con las que no hace falta hablar para comunicarnos. Sois un gran tesoro y me siento afortunada y orgullosa de la larga y profunda amistad que nos une. Emma, Anita, Elena, Marta, Susana, Esther y Pati, gracias por estar siempre ahí y por creer en mí. Gracias también a mis amigos Luis, Rafa, Alberto, Richard, Borja y Ramón, ya que sin ellos nada sería lo mismo. Y a las nuevas incorporaciones de la gran pandilla, Samu, Cris, Paco, Susana, Esther, Ana, Aldara, Beltrán, Juan, Irene, Lúa, Celia y Antón, son el futuro, y ¡menudo futuro más brillante!

A mi “laotong” Amil, y a toda su familia, que la siento como mía. Ami, eres como una hermana para mí, eres uno de mis grandes apoyos en esta vida, y no tengo palabras para agradecerte todo lo que me aportas. A David por el cariño que siempre me demuestras, las charlas, las cenas con buen vino, los consejos y el tiempo dedicados. A Aníbal, Violeta y especialmente a mi ahijado Roque, por hacerme la vida más alegre y bonita, por sus besos, abrazos y constantes muestras de cariño que me llenan de felicidad. Al padrino Chiri, por ser un compadre como ninguno, y a la tía Bibi por compartir a sus sobrinos.

A mis grandes amigos y científicos marinos Elena y Stefan y a la pequeña Marina, por todo el tiempo compartido desde que nos conocimos en Islandia. Fue una gran suerte haberos encontrado en mitad del país del hielo, y más aún haberos conservado hasta estos días. Ele, gracias por tu gran amistad, y gracias también por tu implicación y ayuda en la escritura de esta Tesis Doctoral, has aportado un punto de vista muy marino.

A mi amiga Marichu, por ser una maestra para mí, por tu ayuda desinteresada en todo momento, por tu generosidad, por tu tiempo, pero, sobre todo, por la amistad que hemos construido.

A mi queridísima Olga, por el tiempo compartido en la Facultad de Farmacia entre prácticas y apuntes, las risas y los divertidos momentos de estudio, por todo lo que hemos vivido desde entonces, pero sobre todo por el reencuentro. Por supuesto, a la princesa, Olga Jr., y a Fede, porque son parte de ti y eso los hace especiales para mí.

A mi cuadrilla, Mari, Josune, Eli, Araitz, Ane, Soni, Eva y Marta por los tiempos vividos en Sukarrieta y la sincera amistad que nos une desde entonces. Gracias a vosotras, el tiempo que viví en el País Vasco fue una de las mejores etapas de mi vida. A María Tovar y toda su familia, por su alegría, las largas charlas y todos los momentos divertidos que pasamos juntas. ¡Eskerrik asko!

A todas aquellas personas que están presentes en mi vida y que de una u otra forma han contribuido al éxito y el desarrollo de este trabajo. A mi ahijado Sergio y toda su familia,

Antonio, Antoñito y M^a Jesús; a María B., por todas las vivencias que hemos compartido y seguiremos compartiendo; a Ale y Carmen, por estar siempre dispuestos a acogerme en su casa; a mi querida amiga chilena Katy, por esas largas y sabias conversaciones en las que siempre aprendo algo nuevo; a Helen y Ketes, por acogerme en vuestra casa de Madrid durante la realización de esta Tesis Doctoral y por los momentos tan divertidos que hemos pasado juntos; a Pilar y Emilio, por ser como unos padres para mí; a Antonio Fernández-Villegas, por traer paz al hogar; a Marisa, por cuidarme como a una hija más; a Marita, por ser una de las mejores pianistas que conozco y ponerle banda sonora a las tardes de los miércoles; a Chato y Vero, por estar siempre ahí; a Andrea y Marcus, por acogerme desde el primer momento; a Montse y Tucho, por ser los mejores caseros; a Kiko, porque eres como un hermano; a Manolo, por tu alegría y generosidad en todo lo que haces, y a todo el equipo de Materia, por hacerme las mañanas más amenas con la lectura del mejor periódico científico que conozco; a Lorenzo, por tu animosidad, tu generosidad y porque siempre me has escuchado y dado sabios consejos; al Dr. Javier de la Fuente, porque, para mí, es el mejor médico del mundo; auch herzlichen Dank an Jörg für deine Hilfe mit den dreiachsigen Grafiken. Todos vosotros me habéis ayudado a ver las cosas con una perspectiva diferente.

I would also like to thank to Andrew Law and his lovely family, Derek, Catherine, Yvonne and Sabrina. Andrew, I know that I have a home in Taiwan as well as all of you have a home in Spain, and I am glad to have all of you in our lives.

Especialmente quiero dar las gracias a mi familia, por creer en mí y aguantarme todo este tiempo. A mis padres, por vuestro apoyo incondicional, vuestros sabios consejos y todo el amor que me habéis brindado siempre. Todo lo que soy y todo lo que tengo os lo debo a vosotros. A mis hermanos Pablo, Álvaro y Gonzalo, por estar ahí siempre que os necesito, por ayudarme a relativizarlo todo con risas e interminables conversaciones, y por ser un continuo ejemplo de vida y una fuente de inspiración constantes. A mis abuelos Antonio, Josefina, Paco y Ana, porque los que no están sé que estarían orgullosos de mí, y la que me queda es una verdadera matriarca con 100 años muy bien llevados que sigue interesada y dándome su apoyo en todo lo que hago. A todos mis tíos y mis primos, pero principalmente a Dietmar, Alejandro, Christian y Philip, porque este trabajo está especialmente dedicado a vuestra madre, mi madrina y tía Carmen. Finalmente quiero agradecerle a Javi por estar a mi lado todo este tiempo. Gracias por tu paciencia, por toda la ayuda y el apoyo que me has mostrado siempre, y por contribuir a que este trabajo haya finalizado felizmente.

A todos vosotros ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
 Capítulo I/Chapter I	
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	13
GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES	19
 Capítulo II	
INTRODUCCIÓN	25
II.1. EL PESCADO Y LOS PRODUCTOS DE LA PESCA	27
II.1.1. HISTORIA DE LA PESCA	27
II.1.2. EL MAR COMO FUENTE DE RECURSOS PESQUEROS	32
II.1.2.1. PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA PESQUERA	33
II.1.2.2. ESPECIES ACUÍCOLAS DE INTERÉS PESQUERO	35
II.1.2.3. HÁBITAT DE LAS ESPECIES MARINAS	37
II.1.3. ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA	37
II.1.3.1. PRODUCCIÓN PESQUERA MUNDIAL	38
II.1.3.2. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCA DE CAPTURA (MARINA Y CONTINENTAL)	39
II.1.3.2.1. Producción mundial de la pesca de captura marina	39
II.1.3.2.2. Producción mundial de la pesca de captura continental	41
II.1.3.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCADO PRODECENTE DE LA ACUICULTURA	42
II.1.3.3.1. Producción de pescado y productos de la pesca para consumo humano	42
II.1.3.3.2. Especies producidas en acuicultura	43
II.1.4. LA PESCA EN ESPAÑA	44
II.1.4.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SECTOR PESQUERO ESPAÑOL	45
II.1.4.2. PESCA MARINA O EXTRACTIVA	45
II.1.4.2.1. Caladeros	47
II.1.4.2.2. Marisqueo	48
II.1.4.2.3. Almadrabas	48
II.1.4.3. PESCA CONTINENTAL	49
II.1.4.4. ACUICULTURA	49
II.1.4.5. TRANSFORMACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL PESCADO Y LOS PRODUCTOS DE LA PESCA	52

II.1.4.6. CONSUMO DE PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA	55
II.1.5. CALIDAD DEL PESCADO FRESCO	56
II.1.5.1. ANATOMÍA DEL MÚSCULO DEL PESCADO	57
II.1.5.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PESCADO	58
II.1.5.2.1. Agua	58
II.1.5.2.2. Lípidos	59
II.1.5.2.3. Compuestos nitrogenados	60
II.1.5.2.3.1. Proteínas	60
II.1.5.2.3.2. Nitrógeno no proteico (NNP)	60
II.1.5.2.4. Hidratos de carbono	61
II.1.5.2.5. Vitaminas y minerales	61
II.1.5.3. CAMBIOS <i>post mortem</i> EN EL PESCADO	62
II.1.5.3.1. Cambios autolíticos.....	62
II.1.5.3.1.1. Cambios autolíticos en los hidratos de carbono.....	62
II.1.5.3.1.2. Cambios autolíticos en los nucleótidos.....	63
II.1.5.3.1.3. Cambios autolíticos en las proteínas.....	63
II.1.5.3.1.4. Cambios autolíticos producidos por enzimas digestivas.....	64
II.1.5.3.1.5. Cambios autolíticos durante el almacenamiento en congelación.....	64
II.1.5.3.1.6. Hidrólisis y oxidación de los lípidos.....	64
II.1.5.3.2. Cambios microbiológicos	65
II.1.5.3.2.1. Microbiota inicial de los peces	65
II.1.5.3.2.2. Cambios en la microbiota durante el almacenamiento y el deterioro	66
II.1.5.3.3. Cambios sensoriales.....	68
II.1.5.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO	69
II.1.5.4.1. Métodos sensoriales	69
II.1.5.4.2. Métodos químicos.....	71
II.1.5.4.2.1. Métodos basados en la medida de la degradación del ATP	71
II.1.5.4.2.2. Métodos basados en cambios en la fracción nitrogenada básica	71
II.1.5.4.2.3. Métodos basados en cambios en la fracción lipídica	72
II.1.5.4.3. Métodos físicos	72
II.1.5.4.3.1. Determinación del pH muscular	73
II.1.5.4.3.2. Determinación de las propiedades eléctricas de la carne del pescado ...	73
II.1.5.4.3.3. Determinación de las propiedades de textura	73
II.1.5.4.4. Métodos microbiológicos	74
II.1.6. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA	74
II.1.6.1. PESCADO COMERCIALIZADO VIVO.....	75

II.1.6.2. REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN	75
II.1.6.3. SALAZÓN.....	77
II.1.6.4. AHUMADO	78
II.1.6.5. MARINADO	78
II.1.6.6. FERMENTACIÓN	79
II.2. BACTERIAS LÁCTICAS	80
II.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS.....	80
II.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	81
II.2.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	83
II.2.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS	83
II.2.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos	84
II.2.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD.....	86
II.2.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos	86
II.2.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales	87
II.2.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas	88
II.2.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y ENFERMEDAD	88
II.3. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: BACTERIOCINAS	89
II.3.1. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL	89
II.3.2. BACTERIOCINAS	91
II.3.2.1. DEFINICIÓN	91
II.3.2.2. BACTERIOCINAS vs. ANTIBIÓTICOS	92
II.3.2.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	93
II.3.2.3.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas	94
II.3.2.3.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas	96
II.3.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS	96
II.3.3.1. CLASIFICACIÓN	98
II.3.3.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA.....	100
II.3.3.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA.....	102
II.3.3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN	103
II.3.3.5. PURIFICACIÓN	104
II.3.3.6. MODO DE ACCIÓN	106
II.3.3.7. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS	109
II.3.3.7.1. Gen(es) estructural(es).....	110

II.3.3.7.2. Gen(es) de inmunidad	111
II.3.3.7.3. Genes de transporte y procesamiento.....	113
II.3.3.7.3.1. Sistema de transporte del tipo ABC o sistema de transporte dedicado	114
II.3.3.7.3.2. Sistema Sec o ruta general de secreción	117
II.3.3.7.3.2.1. Componentes integrales de membrana de la translocasa	118
II.3.3.7.3.2.2. SecB y partícula reconocedora de señal (SRP).....	118
II.3.3.7.3.2.3. SecA y mecanismo de translocación proteica.....	119
II.3.3.7.3.2.4. Peptidasa señal.....	119
II.3.3.7.4. Genes de regulación de la producción: sistema de transducción de señal de tres componentes	122
II.3.3.7.4.1. Péptido inductor.....	122
II.3.3.7.4.2. Proteína histidín-quinasa y proteína reguladora de respuesta: transducción de señal	123
II.3.3.8. RESISTENCIA ADQUIRIDA.....	124
II.3.3.9. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	126
II.3.3.9.1. Pruebas biológicas	126
II.3.3.9.2. Pruebas genéticas	127
II.3.3.9.3. Pruebas inmunoquímicas	127
II.3.3.9.3.1. Aplicación de anticuerpos frente a bacteriocinas.....	128
II.3.3.10. APLICACIONES DE LAS BACTERIOCINAS	129
II.3.3.10.1. Industria alimentaria	129
II.3.3.10.1.1. Bioconservación de alimentos	129
II.3.3.10.2. Otras aplicaciones	136
II.4. GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	141
II.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS	141
II.4.2. IMPORTANCIA DE LOS LACTOBACILOS EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y FARMACÉUTICA.....	146
II.4.2.1. LACTOBACILOS Y ALIMENTOS	146
II.4.2.1.1. Presencia natural de lactobacilos en leche y productos lácteos.....	147
II.4.2.1.2. Presencia natural de lactobacilos en carne y productos cárnicos	148
II.4.2.1.3. Presencia natural de lactobacilos en vegetales y material de origen vegetal.....	149
II.4.2.1.4. Presencia natural de lactobacilos en pescado y productos pesqueros	150
II.4.2.2. LACTOBACILOS Y SALUD	153
II.4.2.2.1. Cultivos probióticos	153
II.4.2.2.1.1. Cultivos probióticos en acuicultura	156
II.4.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	159

II.4.4. PROBLEMÁTICA SANITARIA DE LOS MICROORGANISMOS DEL GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	163
II.4.4.1. PATOGENICIDAD DE LOS LACTOBACILOS	163
II.4.4.1.1. Virulencia de <i>Lactobacillus</i>	165
II.4.4.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LOS LACTOBACILOS	166
II.4.4.2.1. Selección del medio y determinación de los puntos de corte para la determinación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos	166
II.4.4.2.2. Resistencia a antibióticos	168
II.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS	169
II.5.1. SISTEMA NICE	172
II.5.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS MEDIANTE SISTEMAS DE GRADO ALIMENTARIO	174

Capítulo III/Chapter III

ACTIVIDAD BACTERIOCINOGENICA DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PESCADO, MARISCO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

BACTERIOCIN PRODUCTION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FISH, SEAFOOD AND FISH PRODUCTS	177
III.1. ABSTRACT	179
III.2. INTRODUCTION	179
III.3. MATERIALS AND METHODS	183
III.3.1. Bacterial strains and culture conditions	183
III.3.2. Isolation and direct antimicrobial activity of LAB from fish, seafood and fish products	185
III.3.3. Screening for bacteriocin-producing LAB isolates	185
III.3.4. Taxonomic identification of LAB isolates	187
III.3.5. PCR detection of enterocin structural genes and potential virulence factors	189
III.3.6. Gelatinase, hemolysin and protease production, and antibiotic susceptibility testing	189
III.4. RESULTS	190
III.4.1. Composition of bacterial microbiota from fish, seafood and fish products, and incidence of LAB with direct antimicrobial activity	190
III.4.2. Screening for bacteriocin-producing LAB	194
III.4.3. Taxonomic identification of LAB with direct antimicrobial activity	195
III.4.4. Detection of enterocin structural genes in <i>Enterococcus</i> spp. isolates	203
III.4.5. In vitro safety aspects of the bacteriocinogenic enterococcal LAB	203
III.4.6. Bacteriocin self- and cross-immunity of the bacteriocinogenic LAB	205

III.5. DISCUSSION	206
III.6. REFERENCES	213
 Capítulo IV/Chapter IV	
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO Y EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE <i>Lactobacillus curvatus</i> BCS35: UNA CEPA AISLADA DE BACALAO SALADO (<i>Gadus morhua</i>) CON UNA POTENTE ACTIVIDAD ANTIMIROBIANA FRENTE A <i>Listeria monocytogenes</i>	
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND SAFETY EVALUATION OF <i>Lactobacillus curvatus</i> BCS35: A STRAIN ISOLATED FROM DRY-SALTED COD (<i>Gadus morhua</i>) WITH A STRONG ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST <i>Listeria monocytogenes</i>	237
IV.1. ABSTRACT	239
IV.2. INTRODUCTION	239
IV.3. MATERIALS AND METHODS	244
IV.3.1. Bacterial strains and culture conditions	244
IV.3.2. PCR detection of <i>CurA</i> , <i>SakP</i> and <i>SakQ</i> structural genes in <i>Lactobacillus</i> spp. strains.....	244
IV.3.3. Bacteriocin activity assays	246
IV.3.4. Bacteriocin purification, mass spectrometry and amino acid sequencing	247
IV.3.5. Nucleotide sequencing	248
IV.3.6. In vitro safety evaluation of <i>Lb. curvatus</i> BCS35.....	249
IV.4. RESULTS	249
IV.4.1. PCR detection of <i>curA</i> , <i>sppA</i> and <i>sakQ</i> in <i>Lb. curvatus</i> BCS35.....	249
IV.4.2. Comparative extracellular antimicrobial activity of <i>Lb. curvatus</i> BCS35, <i>Lb. sakei</i> LTH673 and <i>P. acidilactici</i> 347	251
IV.4.3. Purification and mass spectrometry of <i>CurG14</i> , <i>CurG15</i> , <i>SakP</i> and <i>PedPA-1</i> from <i>Lb. curvatus</i> BCS35, <i>Lb. sakei</i> LTH 673 and <i>P. acidilactici</i> 347, respectively, and amino acid nucleotide sequence of <i>CurG15</i>	252
IV.4.4. Nucleotide sequence of <i>CurG14</i> (<i>SakP</i> variant), <i>CurG15</i> (<i>SakX</i>), <i>SakT</i> (<i>SakTa</i> and <i>SakTβ</i>), and <i>SakQ</i> structural genes from <i>Lb. curvatus</i> BCS35	256
IV.4.5. Specific antimicrobial activity of purified class IIa bacteriocins <i>CurG14</i> (<i>SakP</i> variant) <i>CurG15</i> (<i>SakX</i>), <i>SakP</i> and <i>PedPA-1</i>	262
IV.4.6. In vitro safety evaluation of <i>Lb. curvatus</i> BCS35.....	263
IV.5. DISCUSSION	263
IV.6. REFERENCES	268

Capítulo V/Chapter V
BIOCONSERVACIÓN DEL PESCADO FRESCO, PESCADILLA (*Merluccius merluccius*) Y GALLO (*Lepidorhombus boscii*), UTILIZANDO BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENICAS DE ORIGEN MARINO

BIOPRESERVATION OF FRESH FISH, YOUNG HAKE (<i>Merluccius merluccius</i>) AND MEGRIM (<i>Lepidorhombus boscii</i>), USING BACTERIOCINOGENIC LACTIC ACID BACTERIA OF MARINE ORIGIN	279
V.1. ABSTRACT	281
V.2. INTRODUCTION	282
V.3. MATERIALS AND METHODS	285
V.3.1. Bacterial strains and culture conditions	285
V.3.2. Fresh fish, batch description and storage conditions	286
V.3.3. Microbiological analyses	290
V.3.4. Sensory evaluation	291
V.4. RESULTS	292
V.4.1. Effect of the application strategies of bacteriocinogenic LAB of marine origin on the microbiological and sensory quality of fresh landed young hake and megrim during refrigeration storage	292
V.4.1.1. Microbiological determinations	292
V.4.1.2. Sensory evaluation	294
V.4.2. Biopreservation of fresh landed young hake and megrim with <i>Lb. curvatus</i> BCS35	299
V.4.2.1. Microbiological analyses	299
V.4.2.2. Sensory evaluation	300
V.5. DISCUSSION	301
V.6. REFERENCES	306

Capítulo VI/Chapter VI
PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS G14 Y G15: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SU PRODUCCIÓN POR *Lactobacillus curvatus* BCS35 Y CEPAS RECOMBINANTES DE *Lactococcus lactis* MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS E INMUNOQUÍMICAS

HETEROLOGOUS PRODUCTION OF CURVACINS G14 AND G15: DETECTION AND QUANTIFICATION OF THEIR PRODUCTION BY <i>Lactobacillus curvatus</i> BCS35 AND RECOMBINANT STRAINS OF <i>Lactococcus lactis</i> STRAINS BY MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES	313
--	-----

VI.1. ABSTRACT	315
VI.2. INTRODUCTION	316
VI.3. MATERIALS AND METHODS	319
VI.3.1. Bacterial strain, plasmids, media and culture conditions	319
VI.3.2. Basic genetic techniques and enzymes	320
VI.3.3. PCR amplifications and nucleotide sequencing	320
VI.3.4. Construction of the recombinant plasmids derived from pNZ8048 and transformation in <i>Lc. lactis</i> NZ9000	321
VI.3.5. Bacteriocins assays	323
VI.3.6. Production of specific anti-CurG14 and CurG15 polyclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	324
VI.3.5.1. Design and synthesis of antigenic peptides	324
VI.3.5.2. Preparation of immunoconjugates and rabbit-immunization	324
VI.3.5.3. ELISA	324
VI.3.7. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by <i>Lc. lactis</i> NZ9000 recombinant strains and <i>Lb. curvatus</i> BCS35	325
VI.3.8. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant CurG14 and CurG15	326
VI.4. RESULTS	327
VI.4.1. Construction of recombinant <i>Lc. lactis</i> hosts producing CurG14 and CurG15	327
VI.4.2. Antimicrobial activity of recombinant strains	327
VI.4.3. Purification and mass spectrometry analysis of CurG14 and CurG15 produced by the recombinant strains	329
VI.4.4. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by <i>Lc. lactis</i> NZ9000 recombinant strains	330
VI.4.4. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by <i>Lb. curvatus</i> BCS35	332
VI.5. DISCUSSION	335
VI.6. REFERENCES	339
 Capítulo VII/Chapter VII	
DISCUSIÓN INTEGRADORA	349
VII.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO	352
VII.1.1. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DEL PESCADO, MARISCO Y PRODUCTOS DE LA PESCA	353

VII.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN MARINO	359
VII.1.3. IDENTIFICACIÓN Y FILICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ORIGEN MARINO	360
VII.1.4. BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO	362
VII.1.5. DETECCIÓN DE GENES ESTRUCTURALES DE ENTEROCINAS EN LAS CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. DE ORIGEN MARINO	365
VII.1.6. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE LAS CEPAS DE <i>E. faecium</i> BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO	366
VII.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO Y EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA SEGURIDAD DE <i>Lactobacillus curvatus</i> BCS35	370
VII.2.1. DETECCIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA CURVACINA A, SAKACINA P Y SAKACINA Q EN LAS CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> spp. DE ORIGEN MARINO	372
VII.2.2. PURIFICACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE CurG14, CurG15, SakP y PedPA-1, PRODUCIDAS POR <i>Lb. curvatus</i> BCS35, <i>Lb. sakei</i> LTH673 y <i>P. acidilactici</i> 347, RESPECTIVAMENTE, Y SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA CurG15.....	373
VII.2.3. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE CurG14, CurG15, SakQ y SakT (SakTa y SakTβ) DE <i>Lb. curvatus</i> BCS35.....	375
VII.2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ESPECÍFICA DE LAS BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa PURIFICADAS A HOMOGENEIDAD	377
VII.2.5. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA SEGURIDAD DE <i>Lb. curvatus</i> BCS35	380
VII.3. BIOCONSERVACIÓN DEL PESCADO FRESCO, PESCADILLA (<i>Merluccius merluccius</i>) Y GALLO (<i>Lepidorhombus boscii</i>) UTILIZANDO BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO	381
VII.3.1. ESTRATEGIAS DE APLICACIÓN DE LAS CEPAS <i>Lb. curvatus</i> BCS35 y <i>E. faecium</i> BNM58 DE ORIGEN MARINO PARA INCREMENTAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DEL PESCADO FRESCO RECIÉN CAPTURADO	383
VII.3.1.1. Análisis microbiológicos y evaluación sensorial	384
VII.3.2. BIOCONSERVACIÓN DE PESCADO FRESCO RECIÉN CAPTURADO CON <i>Lb. curvatus</i> BCS35	386
VII.3.2.1. Análisis microbiológicos y evaluación sensorial.....	387
VII.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS G14 Y G15 Y DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SU PRODUCCIÓN POR LA CEPA MULTIBACTERIOCINOGÉNICA SALVAJE <i>Lb. curvatus</i> BCS35 Y CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Lc. lactis</i> MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS E INMUNOQUÍMICAS	388
VII.4.1. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Lc. lactis</i> PRODUCTORAS DE CurG14 y CurG15.....	389

VII.4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE CurG14 y CurG15 PRODUCIDAS POR CEPAS RECOMBINANTES DE <i>Lc. lactis</i> NZ9000 Y LA CEPA MULTIBACTERIOCINOGÉNICA SALVAJE <i>Lb. curvatus</i> BCS35	390
 Capítulo VIII/Chapter VIII	
CONCLUSIONES	395
CONCLUSIONS	399
 Capítulo IX	
TRABAJO FUTURO	403
 Capítulo X	
BIBLIOGRAFÍA	413
 Capítulo XI/Chapter XI	
RESUMEN AMPLIADO	485
XI.1. INTRODUCCIÓN	487
XI.2. OBJETIVOS.....	489
XI.3. RESULTADOS.....	490
XI.4. CONCLUSIONES	493
XI.5. BIBLIOGRAFÍA.....	496
EXTENDED ABSTRACT	499
XI.1. INTRODUCTION.....	501
XI.2. OBJECTIVES.....	502
XI.3. RESULTS	504
XI.4. CONCLUSIONS	507
XI.5. REFERENCES	508
 Apéndices	
APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS	511
1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES	513
2. ABREVIATURAS DE UNIDADES	518

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS	518
4. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS	519
5. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS	519
APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO	520
APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS	520
APÉNDICE 4. GLOSARIO	521
APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS	526
APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS	529

RESUMEN

Los objetivos desarrollados en este trabajo de investigación fueron los siguientes: (i) aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca) con actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos del pescado y los productos de la pesca; (ii) evaluación del potencial biotecnológico y la seguridad de la cepa con un mayor espectro de acción antimicrobiana, *Lactobacillus curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado (*Gadus morhua*), lo que incluye la caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas; (iii) desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado a escala de laboratorio y semiindustrial utilizando las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas (*i.e.*, bacteriocinogénicas) de origen marino seleccionadas, *Lb. curvatus* BCS35 y *Enterococcus faecium* BNM58, aislada de bonito (*Thunnus alalunga*), y, por último, (iv) producción heteróloga de las bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* BCS35 y detección y cuantificación de su producción por la bacteria láctica multibacteriocinogénica salvaje y las bacterias recombinantes bacteriocinogénicas generadas en este trabajo, empleando para ello diversas técnicas microbiológicas e inmunoquímicas. En el Capítulo III se describe el aislamiento, el espectro de acción antimicrobiana y la caracterización de bacterias lácticas bacteriocinogénicas aisladas de una amplia variedad de pescados, mariscos y productos de la pesca. Los resultados obtenidos revelaron una gran variación en la población de bacterias lácticas de las muestras, dependiendo del sustrato y la parte anatómica analizada. De la microbiota láctica se seleccionaron un total de 1.245 cepas y se evaluó su actividad antimicrobiana directa mediante la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP) frente a 20 microorganismos indicadores Gram-positivos y Gram-negativos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria. De éstas, 197 bacterias lácticas mostraron actividad antimicrobiana directa en medio sólido, revelando una gran heterogeneidad en su espectro antimicrobiano. Las 64 bacterias lácticas seleccionadas se analizaron mediante un ensayo de difusión en agar (TDA) para determinar su actividad antimicrobiana extracelular, revelando los resultados obtenidos que solamente 25 cepas secretaron sustancias antimicrobianas termoestables de naturaleza proteica (*i.e.*, bacteriocinas) en sus sobrenadantes libres de células. La identificación taxonómica de las 64 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas se llevó a cabo mediante diversas pruebas bioquímicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación nucleotídica del gen que codifica el ARNr 16S (*ADNr 16S*) y/o el gen de la superóxido dismutasa (*sodA*), y/o el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), lo que permitió determinar que 46 cepas pertenecen al género *Enterococcus*, de las que 24 se identificaron como *Enterococcus faecium* y 22 como *Enterococcus faecalis*. En lo que respecta a las 18 cepas no enterococales, siete fueron identificadas como *Pediococcus pentosaceus*, cinco como *Weissella cibaria*, tres como *Lactobacillus sakei* subesp. *carneus*, una como *Lb. sakei* subesp. *sakei*, una como *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus* y una como *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*. Conviene destacar que ninguna de las cepas de *E. faecalis* con actividad antimicrobiana directa mostró actividad antimicrobiana extracelular bajo las condiciones experimentales ensayadas. Las 20 cepas de enterococos bacteriocinogénicos se analizaron mediante PCR para la detección de los genes que codifican enterocinas descritas previamente, lo que reveló que el 90% amplificaron, al menos, uno de los genes estructurales evaluados, siendo los más abundantes los que codifican enterocina L50 (L50A y

L50B) (EntL50 [EntL50A y EntL50B]) y enterocina P (EntP) (65 y 60%, respectivamente). A este respecto, se detectaron hasta cuatro genes estructurales de enterocinas en una misma cepa, en particular los que codifican EntP, EntL50 (EntL50A y EntL50B) y enterocina Q (EntQ). Además, se realizó una evaluación preliminar de la seguridad *in vitro* de las cepas de *E. faecium* mediante la detección de potenciales factores de virulencia, el análisis de la producción de hemolisina y gelatinasa y un ensayo de susceptibilidad a diversos antibióticos de relevancia en medicina humana y veterinaria. Los resultados obtenidos demostraron que el pescado, el marisco y los productos de la pesca constituyen nichos ecológicos adecuados para el aislamiento de bacterias lácticas, incluyendo cepas (multi) bacteriocinogénicas, principalmente enterococos que codifican enterocinas descritas previamente o, en menor medida, no descritas, con un amplio espectro de acción antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

De las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas (20 *E. faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. y 1 *P. pentosaceus*), las cepas *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35 se seleccionaron para su posterior caracterización debido a su amplio espectro de acción y su potente actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. En el capítulo IV se evaluó mediante PCR, empleando cebadores específicos de los genes estructurales que codifican la curvacina A (CurA), sakacina P (SakP) y sakacina Q (SakQ) (*curA*, *sppA* y *sppQ*, respectivamente), la presencia de estos genes estructurales en las cepas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas, mostrando los resultados obtenidos que *Lb. curvatus* BCS35 fue la única cepa que amplificó *sppA* y *sppQ*. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas bacteriocinogénicas *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 (productora de SakP) y *Pediococcus acidilactici* 347 (productora de pediocina PA-1 [PedPA-1]) frente a *Listeria* spp. y diversas bacterias lácticas se comparó mediante TDA y un ensayo en placas microtituladoras (MPA). La purificación de las bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347 se llevó a cabo empleando un protocolo multicromatográfico que incluyó precipitación con sulfato amónico y diversas cromatografías de filtración en gel, intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*), lo que permitió determinar que la actividad antimicrobiana de *Lb. curvatus* BCS35 es debida a la producción de, al menos, dos bacteriocinas. Los dos péptidos purificados, denominados curvacina G14 (CurG14) y curvacina G15 (CurG15), se sometieron a espectrometría de masas, lo que reveló que presentan una masa molecular de 4.460,9 y 4.362,3 Da, respectivamente. Mediante la determinación de su secuencia aminoacídica y/o nucleotídica se determinó que CurG14 y CurG15 son muy similares o idénticas a las bacteriocinas de la clase IIa SakP, previamente descrita en *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992) y sakacina X (SakX), previamente descrita en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), respectivamente. De hecho, CurG14 sólo difiere de SakP en la posición 12 (Tyr en lugar de His), lo que está en concordancia con la diferencia detectada en sus masas moleculares (4.460,9 y 4.435,0, respectivamente). Las bacteriocinas CurG14 (variante de la SakP), CurG15 (SakX), SakP y PedPA-1 purificadas se enfrentaron a diversas cepas de *Listeria* spp. y bacterias lácticas con el objetivo de: (i) comparar su actividad antimicrobiana específica, y (ii) determinar si la sustitución Tyr12/His12 en CurG14/SakP produce algún efecto en la potencia y/o

especificidad antimicrobiana de estas bacteriocinas. Finalmente, se determinó la seguridad *in vitro* de la cepa *Lb. curvatus* BCS35 mediante un ensayo de susceptibilidad a diversos antibióticos de relevancia en medicina humana y veterinaria y el análisis de su actividad hemolisina, gelatinasa y proteasa.

En el Capítulo V se describe el desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado basadas en el empleo de bacterias lácticas multibacteriocinogénicas de origen marino. Para ello, las bacterias lácticas multibacteriocinogénicas *Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58, aisladas previamente de bacalao salado (*Gadus morhua*) y bonito (*Thunnus alalunga*), respectivamente (Capítulo III), se seleccionaron debido a su capacidad para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés para la industria alimentaria como *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens* y *Shewanella putrefaciens*. Para la realización de estos ensayos se seleccionaron dos especies de pescado de gran valor comercial, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus bosci*), y los ejemplares se adquirieron en la lonja de Marín (Pontevedra, España) después de una noche en refrigeración en la bodega de un barco de bajura. El potencial de bioconservación y la estrategia de aplicación de estas dos bacterias lácticas multibacteriocinogénicas se ensayaron primero a escala de laboratorio, inoculándose diversos lotes de pescado fresco con: (i) el cultivo de la bacteria láctica como cultivo protector; y/o (ii) el sobrenadante libre de células como ingrediente alimentario, y/o (iii) sobrenadante liofilizado como ingrediente alimentario liofilizado. Todos los lotes se conservaron en cajas de poliestireno, que se rellenaron continuamente con hielo, y se mantuvieron en una cámara de refrigeración a 0–2°C durante 14 días. Durante este experimento se realizaron tanto análisis microbiológicos, que incluyeron recuentos bacterianos de aerobios mesófilos, coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., estafilococos coagulasa-positivos, *Clostridium* spp. y *Listeria* spp., como análisis sensoriales que incluyen, entre otros, apariencia general, limo de la piel, color y olor de las agallas, morfología del ojo y adherencia del peritoneo. Con base en los resultados obtenidos se seleccionó *Lb. curvatus* BCS35 para realizar los ensayos de bioconservación a escala semiindustrial, en los que se evaluaron combinaciones de tres estrategias diferentes de aplicación. Para ello, esta cepa multibacteriocinogénica se desarrolló en un fermentador semiindustrial en caldo MRS modificado y se inocularon tres lotes de pescado fresco recién capturado con el cultivo protector y/o el ingrediente alimentario, almacenándose a continuación en hielo en una cámara de refrigeración a 0–2°C en la lonja de Marín durante 14 días. Los análisis microbiológicos citados anteriormente se llevaron a cabo durante el periodo de almacenamiento y los resultados mostraron que cuando el cultivo de *Lb. curvatus* BCS35 o el correspondiente sobrenadante libre de células se empleaban como cultivo protector o ingrediente alimentario, respectivamente, los recuentos bacterianos de estos lotes eran significativamente menores que los del lote control, tanto para la pescadilla como para el gallo; además, en ambos ensayos se inhibió la presencia de *Listeria* spp. en las muestras bioconservadas de gallo. Finalmente, un experto tasador oficial de pescado de la lonja de Marín valoró el efecto del cultivo protector y el ingrediente alimentario en las características sensoriales del pescado, concluyendo que los lotes bioconservados alcanzarían un precio más alto en el mercado que los respectivos lotes control, lo que demuestra que la cepa multibacteriocinogénica de origen marino *Lb.*

curvatus BCS35 puede considerarse una candidata apropiada para su aplicación como bioconservante del pescado fresco recién capturado.

El amplio espectro antimicrobiano de las bacteriocinas CurG14 y CurG15 producidas por *Lb. curvatus* BCS35 (Capítulo III), que son responsables, en parte, de la actividad antimicrobiana ejercida por esta cepa multibacteriocinogénica (Capítulo IV), así como la demostración *in vivo* de la eficacia de estas bacteriocinas y la cepa productora para la bioconservación del pescado fresco recién capturado (Capítulo V), motivó el interés en el desarrollo de hospedadores heterólogos que permitieran incrementar la actividad antimicrobiana y/o producción de estas bacteriocinas. A este respecto, en el Capítulo VI se describe la producción heteróloga de CurG14 y CurG15 por *Lactococcus lactis*, así como la detección y cuantificación de su producción por la cepa multibacteriocinogénica salvaje y las cepas recombinantes bacteriocinogénicas mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas. Para ello, quimeras génicas que codifican el péptido señal de la proteína Usp45 (SP_{Usp45}) fusionado a las bacteriocinas CurG14 y CurG15 maduras se clonaron en el plásmido pNZ8048, bajo el control del promotor inducible de nisina A (P_{nisA}), generando los plásmidos pNUG14E y pNUG15E, respectivamente. Estos plásmidos se transformaron en *Lc. lactis* NZ9000, resultando en varias cepas recombinantes de las cuales *Lc. lactis* NZ9000-69 (pNUG14E) y *Lc. lactis* NZ9000-12 (pNUG15E) se seleccionaron para su caracterización. Los análisis de espectrometría de masas de CurG14 y CurG15 purificadas de los sobrenadantes de estas cepas recombinantes demostraron que ambos péptidos se procesan y secretan correctamente. La actividad antimicrobiana y la producción de estas bacteriocinas por las cepas recombinantes se detectó y cuantificó en los sobrenadantes libres de células de los cultivos inducidos con nisina A (NisA), a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀) de 0,3, 0,5 y 0,9, y desarrollados posteriormente durante 1,5, 3 y 5 h, comparándose los resultados obtenidos con los correspondientes a los de los sobrenadantes de los cultivos de *Lb. curvatus* BCS35 desarrollados a 4, 8, 18, 25, 30 y 37°C. La máxima actividad antimicrobiana de las cepas recombinantes seleccionadas *Lc. lactis* NZ9000-69 (pNUG14E) y *Lc. lactis* NZ9000-12 (pNUG15E) (2.430 y 22.843 UB/ml) se alcanzó a un DO₆₀₀ de 0,5 y tras 3 h de crecimiento después de la inducción. De la misma forma, la cuantificación de las bacteriocinas mediante un ensayo enzimático no competitivo (ELISA-NCI) empleando los anticuerpos policlonales específicos para CurG14 y CurG15 obtenidos en este trabajo, reveló que las citadas condiciones de crecimiento también permitieron la máxima producción de ambas bacteriocinas (4.896 y 17.149 ng/ml de CurG14 y CurG15, respectivamente). Conviene destacar que estas concentraciones de CurG14 y CurG15 representaron un aumento de la producción de 20 y 4 veces, respectivamente, con respecto a la máxima producción cuantificada para la cepa salvaje *Lb. curvatus* BCS35, lo que demuestra la utilidad de la estrategia genética desarrollada y de las cepas recombinantes bacteriocinogénicas generadas en este trabajo para la producción heteróloga de estas bacteriocinas de amplio espectro de acción antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

ABSTRACT

The main goals addressed in the present research work were the following: (i) isolation and identification of Lactic Acid Bacteria (LAB) of marine origin (fish, seafood and fish products) with antimicrobial activity against spoilage and food-borne pathogenic bacteria; (ii) assessment of the biotechnological potential and safety of the strain with the wider antimicrobial activity spectrum, *Lactobacillus curvatus* BCS35, isolated from dry salted cod (*Gadus morhua*), including the biochemical and genetic characterization of its bacteriocins; (iii) development of biopreservation strategies for fresh landed fish at laboratory and semi-industrial scales with selected bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) LAB of marine origin, *Lb. curvatus* BCS35 and *Enterococcus faecium* BNM58, isolated from albacore (*Thunnus alalunga*), and (iv) heterologous production of bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, and detection and quantification of their production by the wild-type bacteriocinogenic LAB and the recombinant bacteria generated in this work by microbiological and immunochemical assays. In Chapter III, the isolation, antimicrobial spectrum and preliminary characterization of bacteriocinogenic LAB isolated from a wide variety of fish, seafood and fish products is described. The obtained results revealed a great variation in the LAB population frequencies, depending on the substrate and anatomic source. From the lactic microbiota, a total of 1,245 LAB isolates were randomly selected and assayed for direct antimicrobial activity by a stab-on-agar test (SOAT) against 20 Gram-positive and Gram-negative spoilage and food-borne pathogens of relevance for the food industry. From those strains, a total of 197 LAB exerted direct antimicrobial activity when grown on solid media, showing a great heterogeneity in their antimicrobial spectra. Analysis of the selected 64 LAB for extracellular activity by an agar well-diffusion test (ADT) revealed that only 25 strains secreted heat-stable proteinaceous antimicrobial substances (*i.e.*, bacteriocins) in their cell-free culture supernatants. Biochemical characterization, polymerase chain reaction (PCR) analysis and/or DNA sequencing of the superoxide dismutase gene (*sodA*) and/or 16S rRNA gene (*16S rDNA*), and/or determination of their whole-cell protein profiles by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analyses of the 64 LAB isolates with direct antimicrobial activity showed that 46 strains belong to the genus *Enterococcus*, of which 24 were identified as *Enterococcus faecium*, and 22 as *Enterococcus faecalis*. From the 18 non-enterococcal strains, seven were identified as *Pediococcus pentosaceus*, five as *Weissella cibaria*, three as *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*, one as *Lb. sakei* subsp. *sakei*, one as *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, and one as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Interestingly, none of the *E. faecalis* isolates with direct antimicrobial activity was found to secrete bacteriocins under the stated experimental conditions assayed in this work. The 20 bacteriocinogenic enterococcal isolates were analyzed by PCR for detection of genes encoding previously described enterocins, which showed that 90% amplified, at least, one structural gene, with those encoding enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin P being the most prevalent (65 and 60%, respectively). Up to four target genes were simultaneously detected in a single strain, namely those encoding enterocin P, enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin Q. Moreover, preliminary safety evaluation of *E. faecium* isolates was carried out by detection of potential virulence factors, analysis of hemolysin and gelatinase production, and susceptibility testing to several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine. The obtained results demonstrated the suitability of fish, seafood and

fish products as ecological niches for the isolation of LAB, including (multi)bacteriocinogenic strains, mainly enterococci, encoding previously described or, to a lesser extent, unknown broad antimicrobial spectrum bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and other spoilage and food-borne pathogenic microorganisms of interest for the food industry.

From the 25 bacteriocinogenic LAB (20 *E. faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. and 1 *P. pentosaceus*), *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 and *Lb. curvatus* BCS35 were selected for further characterization because of their broad antimicrobial spectrum and strong inhibitory activity against *L. monocytogenes*. In Chapter IV, PCR analysis with specific primers for curvacin A (CurA), sakacin P (SakP), and sakacin Q (SakQ) structural genes (*curA*, *sppA* and *sppQ*, respectively) were carried out for these lactobacilli revealing that *Lb. curvatus* BCS35 was the only strain that amplified *sppA* and *sppQ*. Comparative bacteriocin activity of the bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 (SakP-producer) and *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1[PedPA-1]-producer) against *Listeria* spp. and LAB strains was determined by an ADT and a microtiter plate assay (MPA). By using a multichromatographic purification procedure including ammonium sulphate precipitation, gel filtration, cation exchange and hydrophobic interaction chromatographies, and reverse-phase liquid chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC), it was determined that the antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35 is due to the production of, at least, two bacteriocins. Both purified peptides, termed curvacin G14 (CurG14) and curvacin G15 (CurG15), were subjected to mass spectrometry analysis, revealing that they are 4,460.9 and 4,362.3 Da in size, respectively. N-terminal amino acid and/or nucleotide sequencing showed that CurG14 and CurG15 are very similar or identical to the class IIa bacteriocins SakP, previously identified in *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992), and sakacin X (SakX), firstly described in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), respectively. In fact, CurG14 only differs from SakP at position 12 (Tyr instead of His), which is in agreement with their differences in molecular mass (4,460.9 and 4,435.0 Da, respectively). Purified CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP, and PedPA-1 were challenged against several strains of *Listeria* spp. and LAB in order to: (i) compare their specific antimicrobial activities, and (ii) determine if the substitution Tyr12/His12 in CurG14/SakP exerts any effect on the bacteriocin potency and/or specificity. Finally, the *in vitro* safety of *Lb. curvatus* BCS35 was determined by susceptibility testing against several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine and analysis of hemolysin, gelatinase and protease activities.

In Chapter V, the development of a biopreservation strategy for fresh landed fish based on the use of multibacteriocinogenic LAB of marine origin is described. For this purpose, two multiple bacteriocin-producing LAB strains, *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58, previously isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) and albacore (*Thunnus alalunga*), respectively (Chapter III), were selected due to their capability to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and several fish-spoilage microorganisms of relevance for the food industry such as *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*. Two commercially important fish species were chosen for this study, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*), and the specimens were acquired at

the Marín (Pontevedra, Spain) retail fish market, after one night in the chilled hold of a near-shore fishing vessel. The biopreservation potential and the application strategies of these two multibacteriocinogenic LAB strains were first tested at a laboratory scale, where several batches of fresh landed fish were inoculated with: (i) the multibacteriocinogenic LAB culture as protective culture; and/or (ii) their cell-free culture supernatant as food ingredient, and (iii) the lyophilized bacteriocin preparation as lyophilized food ingredient. All batches were stored in polystyrene boxes, permanently filled with ice at 0–2°C, for 14 days. Microbiological analyses, including counts of aerobic mesophiles, standard coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., coagulase-positive staphylococci, *Clostridium* spp. and *Listeria* spp., as well as sensorial analyses including general appearance, skin (slime), gills color and odor, eye morphology and peritoneum adherence, were carried out during the biopreservation trials. Subsequently, *Lb. curvatus* BCS35 was selected to up-scale the trials, and combinations of the three application methods were assayed. For this purpose, this multibacteriocinogenic LAB was grown in a semi-industrial scale fermentor in modified MRS broth, and three batches of fresh landed fish were inoculated with the resulting protective culture and/or food ingredient, and stored on ice in a chilled chamber at 0–2°C at the Marín retail fish market for 14 days. Microbiological analyses cited above were carried out during the storage period, showing that when *Lb. curvatus* BCS35 culture or the corresponding cell-free culture supernatant was used as protective culture or food ingredient, respectively, bacterial counts were significantly lower than those of the control batches, both for young hake and megrim. Moreover, the presence of *Listeria* spp. in the biopreserved megrim specimens was inhibited in both analyses. Finally, the effect of the protective culture and the food ingredient on the sensory characteristics of fish was evaluated by an official fish appraiser from the Marín retail fish market, who concluded that all the biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than the respective control batches, demonstrating that the multibacteriocinogenic LAB of marine origin *Lb. curvatus* BCS35 may be considered as a suitable candidate for its application as fresh landed fish biopreservative.

The broad antimicrobial spectrum of the bacteriocins CurG14 and CurG15 produced by *Lb. curvatus* BCS35 (Chapter III), which are partially responsible for the antimicrobial activity exerted by this multiple bacteriocin producer (Chapter IV), as well as the *in vivo* demonstration of the good performance of these bacteriocins and their producer strain in the biopreservation of fresh landed fish (Chapter V), prompted interest in the development of heterologous hosts which could improve bacteriocin antimicrobial activity and/or production. In this respect, Chapter VI describes the heterologous production of CurG14 and CurG15 by *Lactococcus lactis*, as well as their microbiological and immunochemical detection and quantification in the wild-type and the recombinant producer strains. For this purpose, chimeric genes encoding fusions of the signal peptide of the Usp45 (SP_{Usp45}) protein to the mature CurG14 and CurG15 bacteriocins were cloned into the pNZ8048 vector under control of the nisin A-inducible promoter (P_{nisA}), generating the plasmids pNUG14E and pNUG15E, respectively. These plasmids were transformed into *Lc. lactis* NZ9000, resulting in several recombinant strains from which *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) were selected for further characterization. Mass spectrometry analyses of CurG14 and CurG15 purified from the supernatants of

the selected recombinant strains showed that both peptides were correctly processed and secreted. Antimicrobial activity and bacteriocin production of the recombinant strains were detected and quantified in cell-free culture supernatants from cultures induced with nisin A (NisA) at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.3, 0.5 and 0.9, and further grown for 1.5, 3 and 5 h, and compared with those present in the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 cultures grown at 4, 8, 18, 25, 30 and 37°C. The maximum antimicrobial activity of the selected recombinant strains *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) (2,430 and 22,843 BU/ml, respectively) was found at an OD₆₀₀ of 0.5, and 3 h after induction. Likewise, quantification of the recombinant bacteriocins by using a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) and the specific anti-CurG14 and anti-CurG15 polyclonal antibodies generated in this work showed that these conditions also resulted in the maximum production of both bacteriocins (4,896 and 17,149 ng/ml of CurG14 and CurG15, respectively). Interestingly, these concentrations represent a 20- and a 4-fold increase in the production of CurG14 and CurG15, respectively, with respect to the maximum production quantified in the wild-type producer *Lb. curvatus* BCS35, demonstrating the usefulness of the genetic procedure and the recombinant strains generated in this work for the heterologous production of these bacteriocins showing a broad antimicrobial spectrum against food spoilage and pathogenic bacteria of relevance for the food industry.

CAPÍTULO I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS

La actividad pesquera produce uno de los productos alimenticios más perecederos y sujeto generalmente a un extenso comercio internacional, por lo que resulta necesaria una industria, unos medios de conservación y transporte y unas redes de comercialización capaces de mantener una adecuada calidad higiénico-sanitaria y seguridad durante todas las etapas por las que atraviesan estos productos hasta llegar al consumidor final. Ésto es especialmente importante en las zonas pesqueras en las que la flota faena a una gran distancia de su puerto base, como es el caso de la flota pesquera española y, concretamente, la flota gallega. Los largos periodos de tiempo necesarios para el transporte del pescado desde los barcos pesqueros hasta el consumidor proporcionan abundantes oportunidades para el crecimiento microbiano y las contaminaciones cruzadas, haciendo que resulte difícil el mantenimiento de la calidad higiénico-sanitaria y seguridad requeridas para estos productos. Además, los productos que llegan al mercado en buenas condiciones de conservación alcanzan generalmente precios más altos, tanto en el comercio mayorista como en el minorista, y, en consecuencia, generan un mayor rendimiento económico de la actividad pesquera; en estas circunstancias, resulta evidente la necesidad de mejorar la manipulación, el cuidado y la conservación de las capturas. A este respecto, inmediatamente después de la captura de los peces, comienzan a producirse una serie de cambios químicos y biológicos llevados a cabo por las enzimas propias del pescado (cambios autolíticos) y por microorganismos (cambios microbiológicos), que en última instancia pueden conducir a un rechazo del pescado para el consumo humano debido a su descomposición y deterioro. La mayor parte de las operaciones de procesado posteriores a la captura tienen como objetivo ralentizar estos procesos para que el pescado llegue al consumidor en condiciones óptimas. En este contexto, la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas de conservación tras la captura para controlar la carga microbiana del pescado es esencial para: (i) incrementar su vida útil; (ii) reducir las pérdidas físicas, organolépticas y nutricionales, y (iii) preservar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad del producto final. A este respecto, la bioconservación, que se define como la extensión de la vida útil y mejora de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos, resulta una tecnología muy interesante, de fácil aplicación y rentable económicamente que, combinada con otras tecnologías, como, por ejemplo, la refrigeración, puede constituir una estrategia eficaz para la conservación del pescado fresco recién capturado.

Hasta la fecha, se han realizado un gran número de estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas (*i.e.*, bacteriocinogénicas) y/o sus bacteriocinas como bioconservantes de diversos alimentos como, entre otros, la leche, el queso y otros productos lácteos, los productos cárnicos, los vegetales y, en menor medida, el pescado y los productos de la pesca. A este respecto, y de forma general, existen cuatro estrategias para el empleo de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y sus bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la(s) bacteriocina(s) *in situ*, como cultivo protector y/o cultivo iniciador; (ii) adición de un medio fermentado por una bacteria láctica bacteriocinogénica o por una cepa recombinante bacteriocinogénica como ingrediente alimentario; (iii) adición de las bacteriocinas y/o sus mezclas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad como aditivo alimentario, e (iv) incorporación o inmovilización de las bacteriocinas en el material de envasado de los alimentos con el fin de desarrollar un envase activo. En este contexto, conviene destacar

que el desarrollo de estrategias de bioconservación para el pescado y los productos de la pesca requiere la identificación de bacterias lácticas adecuadas para este fin, preferentemente aisladas de la microbiota autóctona del pescado, sus derivados y/o su ambiente acuícola, ya que, presumiblemente, estarán mejor adaptadas a este tipo de hábitats y, por lo tanto, serán más competitivas en estos sustratos que las bacterias lácticas de otros orígenes.

Las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se aíslan frecuentemente de los alimentos, en los que favorecen el desarrollo de sus características organolépticas y reológicas típicas y/o aumentan sus cualidades nutritivas. Además, contribuyen favorablemente a su conservación y seguridad debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y patógenos como, entre otros, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*. Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato alimentario en el que se desarrollan y la formación de ácidos orgánicos (principalmente ácidos láctico y acético), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, también producen otros metabolitos antimicrobianos entre los que se incluyen el etanol, el dióxido de carbono, el diacetilo, el acetaldehído, el peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, el benzoato, los isómeros D de los aminoácidos, la reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, un grupo heterogéneo de sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas. Históricamente, las bacterias lácticas se han asociado a la fermentación espontánea e industrial de los alimentos, por lo que en la actualidad se consideran microorganismos seguros para el consumo humano; esto es, gozan del estatus GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) o su equivalente europeo QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*). Por ello, desde hace tiempo, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos antimicrobianos están recibiendo una gran atención por su posible aplicación como bioconservantes en la industria alimentaria, como una barrera adicional en las estrategias combinadas de conservación de los alimentos (tecnología de obstáculos). A este respecto, esta estrategia permitiría incrementar la vida útil y seguridad de los alimentos, así como reducir el empleo de aditivos químicos y la intensidad de los tratamientos tecnológicos que pudieran interferir negativamente en su calidad organoléptica y/o nutricional.

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos globales: (i) aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca) con actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos del pescado y los productos de la pesca; (ii) evaluación del potencial biotecnológico y la seguridad *in vitro* de la(s) cepa(s) con un mayor espectro de acción antimicrobiana, lo que incluye la caracterización bioquímica y genética de su(s) bacteriocina(s); (iii) desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado a escala de laboratorio y semiindustrial utilizando la(s) bacteria(s) láctica(s) bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s), y, por último, (iv) producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) y detección y cuantificación de su producción por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) salvaje(s) y la(s) bacterias(s) recombinante(s) generadas en este trabajo empleando para ello diversas

técnicas microbiológicas e inmunoquímicas. Para lograr estos objetivos globales resulta necesario proceder al desarrollo y consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento y cuantificación de la microbiota total, láctica y enterococal de diversos sustratos alimentarios de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca).
2. Identificación y preselección de bacterias lácticas de origen marino con actividad antimicrobiana directa y extracelular frente a diversos microorganismos indicadores, entre los que se incluyen *L. monocytogenes* y diversos alterantes y patógenos del pescado y productos de la pesca como *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*, además de diversas bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario caracterizadas previamente.
3. Filiación taxonómica de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa de origen marino seleccionadas.
4. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino frente a otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en las industrias alimentaria, farmacéutica y veterinaria, entre los que se incluyen *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*.
5. Evaluación mediante el empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la presencia en las cepas de *Enterococcus* spp. bacteriocinogénicas de origen marino de genes estructurales que codifican enterocinas descritas previamente.
6. Evaluación de la seguridad *in vitro* de las cepas de *Enterococcus* spp. bacteriocinogénicas de origen marino.
 - 6.1. Evaluación de la susceptibilidad a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria.
 - 6.2. Evaluación mediante PCR de la presencia de los determinantes genéticos que codifican la síntesis de diversos factores de virulencia descritos en el género *Enterococcus*.
7. Evaluación del potencial biotecnológico y la seguridad *in vitro* de la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.1. Evaluación mediante PCR de la presencia de los genes estructurales que codifican bacteriocinas previamente descritas en la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.2. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) del(os) sobrenadante(s) del(os) cultivo(s) de la(s) bacteria(s) láctica(s) de origen marino seleccionada(s) y determinación de su tamaño molecular.
 - 7.3. Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) bacteriocina(s) purificada(s) producidas por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).

- 7.4. Caracterización genética de la(s) bacteriocina(s) producida(s) por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
- 7.5. Determinación de la actividad antimicrobiana específica de la(s) bacteriocina(s) purificada(s) producidas por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
- 7.6. Evaluación de la seguridad *in vitro* de la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
8. Desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco a escala de laboratorio y semiindustrial utilizando la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
9. Obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) para su detección y cuantificación mediante el empleo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).
10. Producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) por *Lactococcus lactis*.
11. Evaluación mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas de la producción de la(s) bacteriocina(s) por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) salvaje(s) y la(s) bacteria(s) recombinante(s) de *Lc. lactis* generadas en este trabajo.

CHAPTER I

GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES

The fishing activity produces a highly perishable food products which are generally subjected to an extensive international trade. Therefore, adequate industries, preservation and transportation strategies, as well as sales and distribution networks capable of maintaining an acceptable standard of hygienic-sanitary quality and safety throughout the entire commercialization process are required. This is especially important in those fishing areas where the fleet works at great distance from its home port, as in the case of the Spanish fishing fleet and, specifically, the Galician fleet. The long periods of time elapsed during fish transportation provide abundant opportunities for microbial growth and cross-contamination from different sources, making the hygienic maintenance required for fish and seafood more difficult to achieve. Products brought to market in well preserved conditions generally yield higher prices in both wholesale and retail markets, and thus give better returns to the fish industry. Therefore, it is necessary to improve upon the manipulation and conservation of fish products. Immediately after capture, several chemical and biological changes take place in dead fish, which can ultimately lead to its rejection for human consumption because of its spoilage, which is the result of a whole series of changes brought about by the own fish enzymes (autolytic changes) and microorganisms (microbiological changes). Most of the fish processing operations aim to slow down these processes so the fish reaches the consumer in optimal conditions. In this context, the research and development of new conservation techniques are essential for controlling the microbial loads in order to: (i) increase shelf-life; (ii) reduce physical, organoleptic and nutritional losses, and (iii) assure the quality and safety of the final product. With regard to this, biopreservation technology, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety by using microorganisms and/or their metabolites, arises as an interesting and cost-effective strategy that combined with other technologies such as refrigeration, could become an effective alternative for preservation of fresh landed fish.

During the last years, bacteriocins and bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) Lactic Acid Bacteria (LAB) have been the focus of extensive research due to their potential use as natural biopreservatives for a variety of foods including, milk and dairy products, meat and meat products, fermented vegetables and, to a lesser extent, fish and fish products. In this respect, there are four main strategies to use bacteriocinogenic LAB and/or bacteriocins as food biopreservatives: (i) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* as a protective and/or starter culture; (ii) use of a substrate previously fermented by a wild or recombinant bacteriocin-producing strain as a food ingredient; (iii) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, and/or (iv) incorporation or immobilization of the bacteriocin in or onto packaging materials for development of bioactive food packaging. It should be noted that the development of biopreservation strategies for fish and fish products requires the identification of suitable LAB strains, preferably belonging to the autochthonous LAB microbiota of fish and its processing environments, since they would be already acclimatized to these habitats, and therefore would be more competitive than LAB from other origins.

LAB constitute a heterogeneous group of microorganisms commonly isolated from food, which boost the development of organoleptic and rheological characteristics and/or increase the nutritional quality of food. Moreover, the preservation capability and enhancement of food safety by LAB is due to their ability to inhibit the development of a wide range of spoilage and food-borne pathogenic

microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus*. The main mechanisms of microbial antagonism of LAB are the competition for nutrients from the culture medium or the food substrate in which they develop, and the formation of organic acids (mainly lactic and acetic acids), with a concomitant drop in the pH. However, they also produce other antimicrobial metabolites including ethanol, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde, hydrogen peroxide and other oxygen-metabolites, benzoate, D-isomers of amino acids, reuterin and other non-proteinaceous compounds of small molecular size, and, finally, a heterogeneous group of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins, referred to as bacteriocins. Historically, LAB have been associated with spontaneous and industrial food fermentations, and thus they are currently considered as safe microorganisms for human consumption, that is, they are awarded the GRAS status (Generally Recognized As Safe) or its European equivalent QPS status (Qualified Presumption of Safety). In this context, bacteriocinogenic LAB and/or their antimicrobial peptides are getting great attention for their application as biopreservatives in the food industry as an additional barrier in the combined strategies of food preservation (hurdle technology). In this respect, this strategy would increase the shelf-life and safety of food, and reduce the use of chemical additives and the intensity of the technological treatments that might interfere negatively with the organoleptic characteristics and/or nutritional value of foods.

Considering the above mentioned information, the main goals of the present research work are the following: (i) isolation and identification of LAB of marine origin (fish, seafood and fish products) with antimicrobial activity against spoilage and food-borne pathogenic bacteria; (ii) assessment of the biotechnological potential and *in vitro* safety of the strain(s) with a wider antimicrobial activity spectrum, including the biochemical and genetic characterization of the bacteriocin(s); (iii) development of biopreservation strategies for fresh landed fish at laboratory and semi-industrial scales with selected (multi)bacteriocinogenic LAB of marine origin, and (iv) heterologous production of selected bacteriocins and detection and quantification of their production by the wild-type (multi)bacteriocinogenic LAB and the recombinant bacteria generated in this work by using microbiological and immunochemical assays. In order to achieve these general goals, the following partial objectives should be addressed:

1. Isolation and quantification of the total, LAB and enterococcal microbiota of a number of foods of marine origin (fish, seafood and fish products).
2. Identification and pre-selection of LAB of marine origin with direct and extracellular antimicrobial activity against several indicator microorganisms such as *L. monocytogenes* and other fish spoilage and pathogenic bacteria as *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as previously characterized bacteriocinogenic LAB from different food origins.
3. Taxonomic identification of the selected LAB with direct antimicrobial activity of marine origin.
4. Determination of the antimicrobial activity spectrum of the bacteriocinogenic LAB of marine origin against other spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*.

5. PCR evaluation of the presence of previously described enterocin structural genes in the bacteriocinogenic *Enterococcus* spp. strains of marine origin.
6. *In vitro* safety evaluation of the bacteriocinogenic *Enterococcus* spp. strains of marine origin.
 - 6.1. Evaluation of the susceptibility to several antibiotics used in human and veterinary medicine.
 - 6.2. PCR evaluation of the presence of the genetic determinants encoding virulence factors previously described in *Enterococcus* spp.
7. Assessment of the biotechnological potential and *in vitro* safety evaluation of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.1. PCR evaluation of the presence of structural genes encoding previously described bacteriocins in the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.2. Purification to homogeneity and molecular mass determination of the bacteriocin(s) from the supernatant(s) of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.3. Determination of the amino acid sequence of the purified bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.4. Genetic characterization of the bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.5. Determination of the specific antimicrobial activity of the purified bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.6. *In vitro* safety evaluation of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
8. Development of a biopreservation strategy for fresh landed fish at laboratory and semi-industrial scales using the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
9. Generation of polyclonal antibodies with specificity for the selected bacteriocin(s) to be used for their detection and quantification by immunoenzymatic assays (ELISAs).
10. Heterologous production of the selected bacteriocin(s) by *Lactococcus lactis*.
11. Evaluation by using microbiological and immunochemical techniques of bacteriocin production by the wild-type (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) and the recombinant strain(s) generated in this work.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. EL PESCADO Y LOS PRODUCTOS DE LA PESCA

II.1.1. HISTORIA DE LA PESCA

La pesca constituye sin duda una de las primeras actividades del hombre encaminada a satisfacer sus necesidades alimenticias. Así se desprende de los restos de bivalvos, crustáceos y peces encontrados en asentamientos cerca de la costa y a orillas de ríos o de lagos. También existen pruebas de esta temprana actividad en grabados en piedra en los que se representan peces y escenas de pesca encontrados en distintas partes de Noruega (Stavanger y Alta). Así pues, se sabe que los inicios de la pesca en su forma más simple se remontan a la Edad de Piedra (*ca.*, 2.500.000–3.000 a. C.) (Rau, 1884; Muus y Dahlström, 1971; Connell y Hardy, 1987; Gobalet y Jones, 1995; Searce, 2009; O'Connor *et al.*, 2011). En el Paleolítico inferior (*ca.*, 2.500.000–100.000 a. C.) las técnicas de pesca eran muy sencillas, limitándose en un principio a una simple recolección, principal actividad del hombre prehistórico. Mientras que en el interior recogía insectos, batracios y frutos diversos para alimentarse, en la costa recolectaba cangrejos, pequeños peces y bivalvos que encontraba al descubierto cuando bajaba la marea. Posteriormente, el hombre prehistórico comenzó a construir barreras artificiales, amontonando piedras para formar pequeños diques y cercados destinados a retener durante la marea baja lo que el mar dejaba a su paso. También se empezaron a utilizar en la pesca los ingenios habituales de la caza tales como la lanza, el arco y las flechas, tanto en las aguas continentales como en el mar (Muus y Dahlström, 1971; Searce, 2009). De esta manera, la pesca, como actividad, se equiparó a la caza, naciendo así una nueva ocupación para los hombres, mientras que la tarea de la recolección se dejaba a las mujeres y los niños (Muus y Dahlström, 1971).



Grabado en piedra de un *halibut*. Grabados rupestres de Alta (Noruega).

Los primeros anzuelos utilizados eran agujas afiladas por ambos extremos, en forma de huso, como las que todavía emplean ciertos pueblos primitivos. A pesar de que el anzuelo en su forma típica fue inventado más tarde que la flecha y el arpón, ya era conocido en la Edad de Piedra donde se tallaban en piedra, cuerno, hueso y madera (Searce, 2009). El anzuelo con la forma con que hoy lo conocemos se utiliza desde la Edad de Bronce¹ (*ca.* 1.800–700 a. C.) y comienzos de la Edad de Hierro (*ca.* 800 a. C–conquista romana) (Muus y Dahlström, 1971). Asimismo, pronto empezaron a tejerse nasas² utilizando ramitas de sauce con una técnica que ha perdurado hasta nuestros días (nasas para anguilas y bogavantes). En los ríos y ensenadas se construían diques que encaminaban los peces hacia el interior de trampas hábilmente dispuestas. También comenzaron a usarse las redes que empleaban en la caza, para capturar peces construyendo cercos y redes de fondo. Los peces atrapados eran cortados, secados al sol o ahumados para así poder conservarlos (Muus y Dahlström, 1971; Connell y Hardy, 1987; Searce, 2009).

¹ La fecha de aparición, duración y contexto de la Edad de Bronce y de la Edad de Hierro varía según la región. En el texto las fechas se refieren a Europa.

² Arte de pesca que consiste en un cilindro de juncos entretejidos, con una especie de embudo dirigido hacia adentro en una de sus bases y cerrado con una tapadera en la otra para poder vaciarlo.

Durante la Edad de Bronce y los comienzos de la Edad de Hierro, la construcción naval experimentó grandes progresos; las balsas y las piraguas (hechas con pieles de animales o vaciando troncos de árboles) dieron paso a embarcaciones impulsadas a remo o a vela (Muus y Dahlström, 1971). Esto permitió el desarrollo de la pesca, que gracias al incremento de las capturas pronto se convirtió en un próspero comercio. Aunque en un primer momento sólo podían beneficiarse de la pesca los pobladores de las costas y de las orillas de los ríos y lagos, ya que el pescado no resiste sin descomponerse un transporte demasiado largo, el descubrimiento de las propiedades conservantes de la sal hizo posible el aumento del consumo de pescado, y su llegada a zonas donde antes no se consumía (Muus y Dahlström, 1971; Moreno y Abad, 1978).

Es muy probable que fueran los egipcios los primeros que utilizaron la salazón y el secado como técnicas de conservación del pescado (Gallart *et al.*, 2005). Así, además del consumo de pescado crudo o asado, existía un importante mercado interior y de exportación para el pescado salado como, por ejemplo, la caballa que se conservaba en salmuera (Sahrhage y Lundbeck, 1992). Poco a poco se fue extendiendo la utilización de la sal como conservante del pescado, y de hecho, se considera que una de las razones por las que el Mediterráneo constituye la cuna de la civilización fue el aprovechamiento de sus salinas. Hace 3000 años, el comercio fenicio del pescado salado y seco era uno de los más florecientes del área mediterránea. Los fenicios fueron los primeros que construyeron salinas de mar y se sirvieron de ellas para salar el pescado y permitir así una conservación más duradera, promoviendo de este modo una gran expansión comercial de este producto (Moreno y Abad, 1978). Los griegos, y especialmente los romanos, también conocían las salazones, que llegaron a tener una gran aceptación gastronómica. La explotación de las salinas y el consumo de sal fueron una importante fuente de ingresos para las finanzas públicas del Imperio Romano, suponiendo un pilar fundamental en su economía y llegando incluso a utilizar la sal como moneda de cambio (Kurlansky, 2003, Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). En esta época, la salazón del pescado llegó a constituir una industria muy desarrollada, impulsada tanto por el incremento de la población como por el descenso de las capturas en aguas costeras. Las principales especies en los mercados romanos eran túnidos, caballa, congrio, salmonete y carpa (Sahrhage y Lundbeck, 1992). El funcionamiento de todas las industrias de salazón era muy semejante; constaban de una larga entrada pavimentada por donde era introducido el pescado, una sala de preparación donde el pescado era eviscerado y cortado en grandes trozos triangulares o cúbicos, con cortes para facilitar la penetración de la sal, y varias salas al aire libre, con grandes cubas de mortero a ras de tierra donde se disponían los trozos de pescado y una cantidad equivalente de sal. Tras 20 días de maceración, el pescado ya salado se envasaba en ánforas con tapones de barro, que se almacenaban para su posterior exportación (Moreno y Abad, 1978). Los romanos también empleaban hielo en invierno para conservar el pescado, pero sobre todo utilizaban *garum*, una salsa hecha de órganos, agallas y colas de pescado. Estos restos se salaban y dejaban fermentar al sol, y el líquido resultante constituía el *garum* que se empleaba además de como conservante como condimento, de forma similar al uso de la salsa de soja en Asia. El *garum* se producía en varios puertos mediterráneos, pero los romanos apreciaban especialmente el procedente de España (Moreno y Abad, 1978; Kurlanski, 2003). Conviene señalar que, a pesar de la importancia del pescado salado en el Mediterráneo, fue necesario el transcurso de un milenio antes de

que los conocimientos sobre la conservación del pescado por medio de la sal llegasen a los pueblos del norte de Europa. En estos países, poco soleados, la evaporación se efectuaba calentando el agua del mar, con fuego de leña o carbón, dentro de grandes recipientes (Muus y Dahlström, 1971).

En la Europa mediterránea las especies que más se salaban eran la sardina, el boquerón, la caballa y el atún; sin embargo en la Europa central y del norte predominaban el arenque y el bacalao, constituyendo ambos la base de un importante comercio a lo largo de la historia. En este contexto, la pesca del arenque empezó a desarrollarse en la costa oriental de Inglaterra alrededor del año 1000. En aquella época Yarmouth (Gran Bretaña) era uno de los lugares de pesca más importantes. Simultáneamente, la pesca se extendió por el Canal de la Mancha y el sur del Mar del Norte, en aguas de Dieppe, Calais y los Países Bajos (Muus y Dahlström, 1971).

El principal centro europeo productor de arenques salados se encontraba durante el siglo XIII en la región sur del Oresund³ (Dinamarca). El monopolio de este comercio estaba en manos de las ciudades hanseáticas alemanas⁴, que adquirieron de los soberanos daneses los privilegios establecidos y administraron la explotación durante más de 400 años. Hacia el año 1500 se dejó sentir sobre el mercado del arenque la competencia flamenca y las ciudades alemanas perdieron poco a poco su monopolio (Muus y Dahlström, 1971; Sahrhage y Lundbeck, 1992). En un principio, el arenque danés era salado tal cual salía del mar; más tarde se introdujeron la evisceración y el lavado, lo que mejoró enormemente tanto su conservación como su calidad. Los holandeses aprendieron los métodos de preparación de los comerciantes alemanes y en el transcurso de los años los mejoraron hasta el punto de que su pesquería de arenque llegó a ser la primera a larga distancia de la historia. Este éxito se basó sobre todo en tres factores: (i) el salado del pescado a bordo, inmediatamente tras su captura, con un corte especial para eliminar las vísceras y la sangre; (ii) un método de conservación y envasado mejorado, y (iii) un sistema de ventas muy eficiente. Con el objetivo de mantener la alta calidad del arenque



Principales rutas comerciales de la Liga Hanseática



Pesca del arenque
Olaus Magnus (1490-1557)

flamenco, se dictaron numerosas leyes y ordenanzas sobre los métodos de preparación y el posterior tratamiento del producto, incluyendo la calidad de la sal y la fabricación de los barriles. Se ha estimado que unas 450.000 personas trabajaban directa o indirectamente en esta pesquería al principio del siglo XVII (Muus y Dahlström, 1971; Sahrhage y Lundbeck, 1992; Kurlansky, 2003).

³ El estrecho de Oresund es uno de los tres estrechos daneses que conectan el mar Báltico con el mar del Norte y es una de las vías marítimas más utilizadas en el mundo.

⁴ La Liga Hanseática fue una federación de ciudades del norte de Alemania y de comunidades de comerciantes alemanes en el mar Báltico, los Países Bajos, Noruega, Suecia, Inglaterra, Polonia, Rusia, parte de Finlandia y Dinamarca, así como regiones que ahora se encuentran en Estonia y Letonia

Simultáneamente al desarrollo de la pesca del arenque en aguas europeas, comenzaba la expansión de otra pesquería de profundo impacto social y económico en el Atlántico Norte. Los noruegos habían encontrado un método de secado del bacalao que permitía su almacenamiento y exportación. El comercio tenía su centro en Bergen (Noruega), y con las relaciones establecidas con Europa mediante las invasiones vikingas, pronto se desarrolló un importante mercado a través del cual Noruega exportaba madera, pieles y pescado e importaba grano. En el siglo XIII, la monarquía noruega prohibió el comercio directo con Islandia, entonces colonia suya, y Gran Bretaña fue excluida de Bergen por la Liga Hanseática que perseguía el monopolio del comercio del bacalao (Roberts, 2007). En los siglos XIII y XIV, los comerciantes hanseáticos empezaron a exportar desde Bergen bacalao seco y aceite de hígado de bacalao. Por su parte, los ingleses organizaron en Bristol (Reino Unido) un comercio parecido con Islandia, que había pasado a manos de Dinamarca, pescando a su vez en aguas islandesas desde el siglo XII (Sahrhage y Lundbeck, 1992). El aceite de hígado de bacalao, un subproducto de la pesca del bacalao, se utilizaba principalmente en el proceso de fabricación de los cueros, así como para alumbrar, a pesar de la cantidad de humo y mal olor que despedía. No fue hasta el año 1775 cuando en Inglaterra se reconoció la acción profiláctica de este producto sobre el raquitismo. Cincuenta años más tarde encontró aplicaciones en toda Europa gracias a su alto contenido en vitaminas A y D (Muus y Dahlström, 1971). La pesca del bacalao también fue muy activa en las islas Lofoten, que todavía hoy constituyen uno de los lugares de pesca más importantes de Europa. El bacalao salado y el bacalao seco se exportaban sobre todo a España, Portugal, Italia y Sudamérica.



Pesca medieval en barco
Olaus Magnus (1490-1557)

Las aguas de Terranova, en el Atlántico Noroeste, empezaron a ser frecuentadas principalmente por los pescadores españoles, portugueses y franceses durante la primera mitad del siglo XVI. También los ingleses comenzaron a mandar barcos de pesca en número cada vez mayor a aguas de Terranova a raíz de la exigencia de Dinamarca de cobrar impuestos por la pesca en Islandia y la competencia que suponían las pesquerías holandesas (Sahrhage y Lundbeck, 1992). Hacia el año 1580 había en aquella zona barcos españoles, franceses, portugueses e ingleses, pero una vez que los piratas expulsaron a los españoles y los portugueses, Francia e Inglaterra asumieron el control de la pesca de estas aguas. En 1583, los ingleses



Comercio de pescado secado y salado
Olaus Magnus (1490-1557)

ocuparon la isla y obligaron a los franceses a pescar más hacia alta mar, a gran distancia de la costa, lo que les llevó al descubrimiento de los grandes bancos de Terranova, sobre todo de bacalao (Muus y Dahlström, 1971). En primavera, la flota inglesa de pesca enfilaba hacia Portugal para hacer provisión de sal, después se dirigía a Terranova para pescar el bacalao e inmediatamente volvía a Portugal para descargar el bacalao salado. De vuelta a Inglaterra, los barcos iban repletos de vino, aceite de oliva y sal. Mientras

que los ingleses dominaban el comercio con la Península Ibérica, los holandeses penetraban en las aguas orientales de Inglaterra y vendían grandes cantidades de pescado en el mercado inglés (Muus y Dahlström, 1971).

Los franceses también competían con Inglaterra por el mercado norteamericano y emprendían cruceros bianuales hacia Terranova donde pescaban con sedal. Las capturas eran saladas a bordo y dispuestas en barricas. El pescado salado francés era de una calidad muy superior a los productos ingleses (Sahrhage y Lundbeck, 1992). La presión pesquera fue en aumento concomitantemente con el incremento de la población, pero a partir de 1810 comenzó una época de baja productividad marina relacionada con cambios en la temperatura que afectó seriamente a la población de peces de Terranova, que vio disminuir sus capturas en dos tercios en el transcurso de 80 años (Rose, 2007). En 1854 se celebró en Londres el “Gran Debate” acerca de la situación de sobrepesca de las especies de mayor interés comercial, que cerró Thomas Huxley con la conclusión más errónea de su carrera: regular las pesquerías era inútil porque posiblemente el bacalao, el arenque, la caballa y otras pesquerías marinas eran inagotables. Esta conclusión no fue aceptada por todos, pero, aun así, se tardó un siglo más en confirmar que la pesca podía afectar a los recursos marinos (Rose, 2007).

A lo largo de los siglos XVIII y XIX tiene lugar el desarrollo de las embarcaciones y de los aparejos de pesca, el descubrimiento de nuevos caladeros y la introducción de mejoras en las técnicas de pesca y conservación de la captura. Durante las guerras napoleónicas se hizo necesaria la preparación de alimentos, de manera que los cuerpos del ejército pudiesen estar constantemente abastecidos de víveres frescos y transportables (Kurlansky, 2003). A finales del siglo XVIII se hicieron los primeros ensayos en recipientes de vidrio. En 1910 fue concedida la primera patente para el envasado de alimentos cocidos en botes de hojalata, desarrollado por Appert, y 15 años más tarde ya se podían adquirir en el comercio salmón, sardinas y cangrejos enlatados (Muus y Dahlström, 1971).

El comercio del pescado fresco no pudo desarrollarse ampliamente hasta después de haber aprendido a conservarlo en hielo picado. En invierno, los lagos helados proporcionaban hielo natural, que también era importado de Noruega, y conservado durante meses en sótanos bien aislados del calor exterior (Muus y Dahlström, 1971). El americano Clarence Birdseye, entre los años 1912 y 1915, descubrió que el secreto de la conservación mediante congelación rápida radicaba en que las bacterias no llegaban a desarrollarse. Además, la congelación rápida daba lugar a pequeños cristales de hielo que no alteraban la calidad del alimento (Kurlansky, 2003). La primera máquina para la fabricación de hielo artificial fue inventada en 1835, pero hubo que esperar hasta 1890 que todos los grandes centros pesqueros fueran equipados con instalaciones frigoríficas. Con la creación de las grandes redes ferroviarias nació la posibilidad de abastecer rápidamente el interior del país de pescado fresco de origen marino, mantenido en hielo. Desde entonces, los productos muy salados, secos o ahumados, que eran de consumo obligado antaño perdieron su atractivo para el consumidor, siendo reemplazados por otros frescos o ligeramente ahumados (Muus y Dahlström, 1971).

De forma similar a lo que sucedió con la industria, la máquina de vapor revolucionó la pesca, posibilitando la construcción de barcos cada vez más grandes, más potentes y con mayor autonomía y

capacidad de procesamiento a bordo. Posteriormente, el desarrollo de la electrónica supuso otro impulso para la pesca extractiva, al dotar a los barcos de sondas y sistemas de detección de peces (Muus y Dahlström, 1971; Roberts, 2007). Con todos estos avances, las flotas aumentaron rápidamente su capacidad en pocas décadas. La Primera y Segunda Guerra Mundial supusieron un descanso que se refleja claramente en las cifras históricas de biomasa libre (Pope and Macer, 1996), aunque por otra parte aceleraron el desarrollo tecnológico que se incorporó a los pesqueros posteriormente.

En un periodo de tiempo muy breve, todas las grandes pesquerías llegaron al colapso, entre las que se incluyen las de bacalao de Terranova, arenque escandinavo y las pesquerías mixtas del Mar del Norte. El agotamiento de los caladeros más cercanos a la costa, la demanda de pescado y los avances tecnológicos han llevado a las flotas a aguas cada vez más distantes y profundas, descubriéndose así zonas de pesca con considerables poblaciones capturables entre las que se encuentran el Mar de Barents, los estrechos daneses y las aguas de la zona occidental de Groenlandia. Mientras que los pequeños vapores de antaño pescaban a profundidades de 20 a 200 m, hoy se explotan comercialmente también los bancos de peces de los taludes preabisales. De esta forma, el número de especies comerciales se ha enriquecido con peces de fondo desconocidos anteriormente como peces de consumo, como ocurre con la gallineta nórdica. Actualmente, los arrastreros modernos trabajan en conexión con buques factoría que se hacen cargo de las capturas para su manipulación y que están equipados, entre otros, con cámaras frigoríficas y máquinas para filetear y fabricar harinas de pescado. No obstante, el problema actual es que, lejos de aprender de los errores cometidos anteriormente, se están explotando nuevos recursos en forma de especies de las que apenas se tiene conocimiento. En este sentido conviene destacar que no es posible llevar a cabo una gestión eficiente y responsable sin conocer los ciclos biológicos y la dinámica de poblaciones, no ya de las especies explotadas, sino también de las especies acompañantes que sufren asimismo un incremento de su mortalidad (Clover, 2005; Roberts, 2007).

II.1.2. EL MAR COMO FUENTE DE RECURSOS PESQUEROS

El concepto genérico de pesca comprende todas las actividades dedicadas a la explotación de los recursos vivos procedentes tanto del mar como de las aguas continentales, y así, puede distinguirse entre pesca marina, pesca continental, acuicultura y extracción de algas, sargazos, corales, etc. Los países de la Unión Europea (UE) gestionan sus pesquerías conjuntamente mediante la Política Pesquera Común (PPC), que reúne una serie de medidas pensadas para que la industria pesquera europea sea próspera y sostenible. Dentro de sus objetivos están: (i) la protección de las poblaciones contra la pesca excesiva; (ii) la garantía de una renta para los pescadores; (iii) el suministro regular de los consumidores y de la industria de transformación a precios razonables, y (iv) la explotación sostenible de los recursos marinos vivos desde el punto de vista biológico, medioambiental y económico.

Dada la naturaleza de las poblaciones marinas, es preciso conseguir un equilibrio entre dos aspectos aparentemente contrapuestos: el mantenimiento de los *stocks* de las poblaciones y la obtención de elevadas capturas que hagan rentables las explotaciones pesqueras. La conservación de este equilibrio

sólo se puede alcanzar aplicando medidas basadas en distintas disciplinas. Así, se encontrarían por una parte, las ciencias que estudian las leyes reguladoras del mar, como la biología marina y la oceanográfica, y, por otra, la economía y la ingeniería naval, auxiliadas por todas aquellas disciplinas como las matemáticas y muy especialmente la estadística que ayudan a definir los modelos de explotación.

II.1.2.1. PRINCIPIOS DE BIOLOGÍA PESQUERA

Las poblaciones marinas son recursos renovables, es decir, las pérdidas causadas por la mortalidad natural es compensada por la incorporación de nuevos individuos producto de la reproducción. Por lo tanto, la pesca actúa sobre las explotaciones pesqueras haciendo descender el número de supervivientes (biomasa total). El esfuerzo pesquero se define como la capacidad de pesca ejercida durante un tiempo determinado en una zona determinada. Niveles de esfuerzo pesquero muy elevado pueden llevar a la biomasa a niveles críticos, de manera que la tasa de renovación de la población sea demasiado pequeña como para soportar las pérdidas generadas por la actividad de la pesca, llevando al colapso de la pesquería. En términos pesqueros, la situación ideal es aquella en la que aplicando un nivel de esfuerzo dado se obtengan, de forma mantenida en el tiempo, las máximas capturas, y lo que se conoce como Rendimiento Máximo Sostenible (RMS). La aplicación de esfuerzos mayores provoca la sobreexplotación del *stock*, mientras que con esfuerzos menores el *stock* se encontraría subexplotado (Gómez, 1987).

En general, los peces se dividen en tres grandes grupos: ciclóstomos (peces no mandibulados como la lamprea y la anguila), cartilaginosos (rayas y tiburones) y teleósteos (con esqueleto óseo), grupo en el que se encuentran el 95% de los peces en general (Love, 1982; Huss, 1999). La apariencia externa de las distintas especies de peces es muy variable, pero en realidad son meras variaciones de una estructura anatómica básica para poder adaptarse a diferentes ambientes. En general, los peces tienen una forma fusiforme, están cubiertos de escamas, poseen respiración branquial y están dotados de aletas para realizar movimientos, proporcionados por sus masas musculares (Love, 1982; Gil, 2010) (Fig. 2.1).

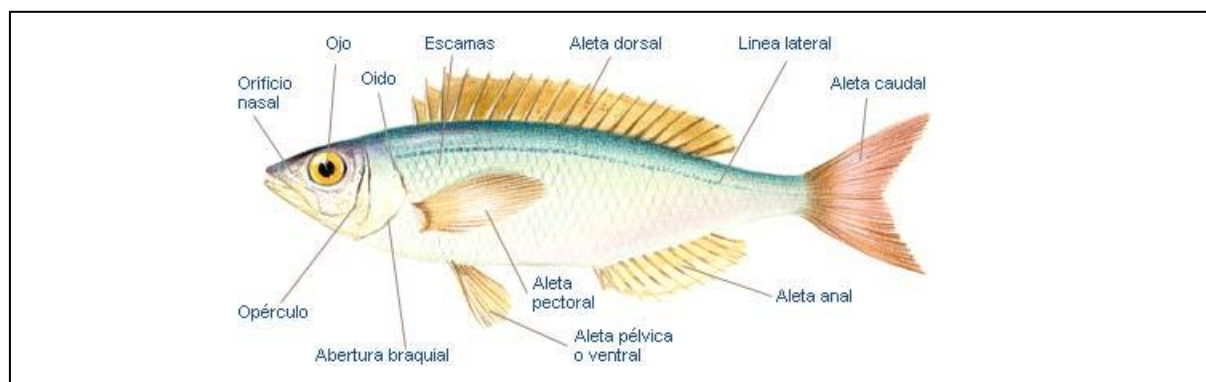


Figura 2.1. Anatomía externa de un pez.

La extracción pesquera hace necesario conocer tanto la localización de las distintas especies en el biotipo marino, como el conjunto de factores biológicos y ambientales que inciden en la dinámica de las poblaciones de dichas especies. Para realizar el análisis esquemático de estos factores biológicos se utiliza el concepto de cadena trófica, que divide a los seres vivos existentes en el mar en niveles enlazados entre sí a través de las relaciones alimenticias establecidas entre ellos, de forma que los seres de un cierto nivel se alimentan de otros del nivel inferior y a su vez constituyen el alimento de los del nivel superior. Los organismos microscópicos vegetales, fundamentalmente algas y bacterias⁵, constituyen el denominado fitoplancton (del griego, *plancton*: errante), siendo éste el primer eslabón en la cadena alimentaria y constituyendo la base para la vida en el mar. El fitoplancton vive suspendido en las masas de agua y sirve de soporte alimenticio al segundo nivel, el zooplancton, constituido por organismos del reino animal, fundamentalmente crustáceos y larvas, cuya movilidad es tan escasa que se limitan a flotar pasivamente en el agua con pequeños desplazamientos verticales relacionados con la intensidad lumínica. El zooplancton sirve de sustento al siguiente nivel de biomasa formado por las especies planctófagas, tales como el arenque, la sardina y la anchoa. En el último eslabón de la cadena se encuentran los seres vivos que se alimentan de los restos de los demás y aquéllos que lo hacen de sus propias capturas, es decir, animales carnívoros y, en especial, los ictiófagos, entre los que se encuentran numerosas especies de interés pesquero, tales como el bacalao, la merluza o el atún (Gómez, 1987).

La masa viva que compone cada nivel de la cadena trófica disminuye en relación 10:1; de forma que cada 1.000 tm de fitoplancton corresponden a 1 tm de ictiófagos (Gómez, 1987). Por lo tanto, la productividad del mar está limitada por su capacidad de generación de fitoplancton, derivado de la conversión de nutrientes en materia orgánica gracias a la energía solar. Los nutrientes son los elementos químicos (carbono, nitrógeno, sales, etc) indispensables para la fotosíntesis y que se encuentran abundantemente en el fondo del mar. Puesto que la energía solar penetra pocos metros a través del agua, es necesario que dichos nutrientes asciendan a las zonas fotosintéticas, lo que se realiza mediante el mecanismo denominado afloramiento, *upwelling* o *bloom*, fenómeno de gran importancia para la riqueza pesquera. La fuente de energía necesaria para que emerjan las capas bajas de agua fría que contienen estos nutrientes procede fundamentalmente de las grandes corrientes marinas permanentes y de las corrientes superficiales producidas por el viento. Entre los afloramientos producidos por los giros de las grandes corrientes superficiales conviene destacar los de la costa noroeste de África, los del Atlántico Norte y la costa de California en el Pacífico, y sus equivalentes en el hemisferio sur, África del Sur y Perú. En el océano Índico aparecen afloramientos importantes en Somalia y Arabia. La importancia de estos fenómenos de afloramiento es determinante en la riqueza pesquera y prevaleciendo sobre aspectos, tales como las características geográficas de la costa y de la plataforma continental, y justifica que, por ejemplo, la productividad de las rías gallegas sea quince veces superior a las más altas de nuestro litoral mediterráneo, a pesar de que la plataforma continental es mucho menor en Galicia (Gómez, 1987).

El hecho de que factores oceánicos, no controlables por el hombre, condicionen el inicio de la cadena trófica afecta al riesgo de explotación de una pesquería de forma muy diferente según la especie

⁵ Entre los organismos que forman el fitoplancton se encuentran las cianobacterias, organismos que se caracteriza por conjugar el proceso de fotosíntesis oxigénica con una estructura celular típicamente bacteriana.

sea planctófaga o no, y, en este último caso, según la edad a la que se dirija la captura. Así, por ejemplo, las perturbaciones oceánicas se acusan de forma directa en los recursos de sardina, ya que tanto la mortalidad de sus larvas como la falta de alimento producen una disminución del *stock* explotable de esta especie de vida corta. Sin embargo, la incidencia de una modificación en los primeros eslabones de la cadena trófica quedaría muy amortiguada en una pesquería como la del bacalao, especie muy longeva en la que una incorporación al *stock* explotable deficiente durante un año puede ser compensada con otra favorable en otro año, y, en definitiva, no se apreciaría gran variación en el *stock* de bacalao con edad comprendida entre cuatro y catorce años, en el que se centra principalmente la captura (Gómez, 1987).

Por lo tanto, a pesar de que los factores ambientales sean cambiantes por naturaleza, existen zonas marinas donde concurren circunstancias favorables o mecanismos compensatorios y se pueden encontrar permanentemente determinados *stocks* con interés pesquero. A estas grandes áreas se les llama caladeros. Aunque hace algún tiempo era suficiente el conocimiento práctico que tenían de los mismos los patrones de pesca, en la actualidad, al adquirir esta actividad caracteres industriales, es necesario aplicar conocimientos científicos para conseguir su aprovechamiento racional, así como para su ordenamiento y regulación. A este respecto, la evaluación y prospección de los *stocks* de los caladeros se realiza mediante la coordinación adecuada entre las organizaciones internacionales, los estados con soberanía en los caladeros o con interés en su explotación, el sector productivo y los Organismos científicos. En virtud de los informes emitidos por estos últimos se negocian los convenios y se fija el Total Admisible de Capturas (TAC), licencias, vedas, etc. No obstante, debe matizarse que en muchas ocasiones resulta difícil separar los fundamentos biológicos de los acuerdos basados en otros intereses distintos, fundamentalmente de carácter político.

II.1.2.2. ESPECIES ACUÍCOLAS DE INTERÉS PESQUERO

El interés pesquero de las distintas especies acuícolas depende tanto de su mercado interior como exterior, debido a que capturas que son ignoradas en ciertas áreas pueden alcanzar una alta cotización en otras. En este contexto, el desinterés por pescar algunas especies abundantes tiende a desaparecer por la facilidad de su exportación o por la disposición de la población a consumir nuevos productos, siempre que exista una campaña de lanzamiento y unos precios competitivos.

Los peces constituyen uno de los grupos más numerosos de los vertebrados, con 20.000 especies conocidas y probablemente muchas más aún por descubrir (Huss, 1999). Para definir las distintas familias de especies que, por su forma de captura y conservación, definen segmentos específicos dentro del sector pesquero, con un mercado y una explotación diferenciada de las otras, se utiliza la clasificación ISSCAAP (del inglés, *International Standard Statistical Classification for Aquatic Animals and Plants*), desarrollada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), en la que las especies acuícolas de interés pesquero se clasifican en 50 grupos y 9 divisiones (Tabla II.1). En esta clasificación, el grupo 1 y parcialmente el grupo 2 forman la pesca denominada continental, que no se incluye normalmente en el Sector Pesquero. El Sector Pesquero comprende los restantes grupos anteriores incluyendo los cultivos

marinos, que explotan especies de los grupos 2, 5 y 9, y la actividad marisquera, centrada en la extracción de carácter estacional de especies del grupo 5.

Tabla II.1. Clasificación de las especies acuícolas de interés pesquero según ISSCAAP^a.

Código	División Grupo de especies	Código	División Grupo de especies
1	Peces de agua dulce	5	Moluscos
11	Carpas, barbos y otros ciprínidos	51	Moluscos de agua dulce
12	Tilapias y otros cíclidos	52	Orejas de mar, bígamos y estrombos
12	Miscelánea de peces de agua dulce	53	Ostras
		54	Mejillones
2	Peces diádromos^b	55	Vieiras
21	Esturiones y sollos	56	Almejas, berberechos y arcas
22	Anguilas	57	Calamares, jibias y pulpos
23	Salmones, truchas y esperlanos	58	Miscelánea de moluscos marinos
24	Sábalos		
25	Miscelánea de peces diádromos	6	Mamíferos marinos
3	Peces marinos	61	Ballenas azules y rorcuales
31	Platijas, halibuts y lenguados	62	Cachalotes y calderones
32	Bacalaos, merluzas y eglefinos	63	Marsopas y delfines
33	Miscelánea de peces costeros	64	Miscelánea de mamíferos marinos
34	Miscelánea de peces demersales		
35	Arenques, sardinas y anchoas	7	Miscelánea de animales acuáticos
36	Atunes, bonitos y agujas	71	Ranas y otros anfibios
37	Miscelánea de peces pelágicos	72	Tortugas
38	Tiburones, rayas y quimeras	73	Cocodrilos y caimanes
39	Peces marinos no identificados	74	Ascidias y otros tunicados
		75	Límulos y otros arácnidos
4	Crustáceos	76	Erizos de mar y otros equinodermos
41	Crustáceos de agua dulce	77	Miscelánea de invertebrados marinos
42	Centollas y cangrejos		
43	Bogavantes y langostas	8	Miscelánea de productos animales
44	Galateas y cigalas	81	Perlas, madreperlas y conchas
45	Gambas y camarones	82	Corales
46	Krill y crustáceos planctónicos	83	Esponjas
47	Miscelánea de crustáceos marinos		
		9	Plantas acuáticas
		91	Algas pardas
		92	Algas rojas
		93	Algas verdes
		94	Miscelánea de plantas acuáticas

^aISSCAAP: *International Standard Statistical Classification for Aquatic Animals and Plants*. ^bLos peces diádromos son aquellos que a lo largo de su ciclo de vida migran entre el agua dulce y el agua salada. Estas migraciones pueden ser de varios tipos, utilizándose los siguientes términos, anádromo (viven principalmente en agua salada y se aparean en agua dulce), catádromo (viven principalmente en agua dulce y se aparean en agua salada) y anfídromo (se mueven entre agua dulce y salada durante su ciclo de vida, pero no por apareamiento).

II.1.2.3. HÁBITAT DE LAS ESPECIES MARINAS

Atendiendo a la profundidad a la que se desarrolla el ciclo vital de las distintas especies acuícolas, éstas pueden clasificarse en distintos grupos. Así se distingue, en primer lugar, el bentos o sistema bentónico, constituido por el conjunto de organismos marinos adaptados a vivir sobre el fondo acuático, donde permanecen fijos, libres o errantes. El bentos se sustenta del detritus del fondo marino y de la actividad de las bacterias marinas que mineralizan la materia orgánica, aprovechándola para su metabolismo, y sirve de alimento a pequeños seres vivos que, a su vez, sustentan a otros del eslabón superior. El bentos también se alimenta del macroplancton que descende en sus movimientos verticales de ciclo diurno. Esta producción sirve de sustento a los peces bentónicos que viven enterrados en el fondo como el gallo, el lenguado o la solla, y a los demersales que viven cerca del fondo, como, entre otros de alto valor comercial, el bacalao, el eglefino, la merluza o la maruca (Gómez, 1987).

Por otra parte, la mayoría de las especies demersales permanecen próximas al fondo marino, aun cuando realicen algún movimiento diurno vertical; por lo tanto, son relativamente sedentarias y se mantienen ligadas a un hábitat en el que se encuentran las condiciones más favorables para su ciclo vital. Estas especies sólo pueden pescarse industrialmente cuando viven a profundidad moderada, es decir, sobre las plataformas continentales o en las regiones del mar libre donde los fondos emergen a cotas reducidas. No obstante, cada día son más los caladeros en explotación a causa del avance tecnológico de los buques que posibilita pescar en fondos relativamente profundos (Gómez, 1987).

Por otra parte, dentro de las especies pelágicas o de superficie, de gran interés pesquero, debe distinguirse entre aquellas que viven agrupadas en cardúmenes dependientes del plancton, como la sardina y el arenque, y las especies migratorias oceánicas, como los túnidos, cuyas migraciones se realizan por diversas causas (alimenticias, térmicas, de desove, etc.) no siempre bien conocidas, como ocurre con la palometa, cuya aparición puede considerarse una variable errática. Cuando estos movimientos migratorios aproximan las poblaciones a la costa, los buques del litoral tienen la posibilidad de capturarlas, dando lugar a lo que se denomina “costeras” tales como las del bonito o anchoa (Gómez, 1987).

II.1.3. ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA

El documento “El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura” (FAO, 2012), también conocido como SOFIA (del inglés, *The State of World Fisheries and Aquaculture*), elaborado por el Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO presenta el panorama mundial de la pesca y la acuicultura, y comprende las tendencias y estadísticas del sector. Este documento se publica bienalmente para proporcionar a los responsables políticos, la sociedad civil y las personas cuyos medios de vida dependen del sector una visión amplia, objetiva y global de la pesca y la acuicultura. A continuación se ofrece un breve resumen de lo que se expone en la última versión disponible de este documento.

II.1.3.1. PRODUCCIÓN PESQUERA MUNDIAL

La pesca de captura o extractiva y la acuicultura, tanto continentales como marinas, suministraron al mundo aproximadamente 148 millones de tm de pescado en 2010 (Tabla II.2), y la mayor parte de esta gran cantidad de pescado se destinó a consumo humano (aprox., 86,5%). Con el crecimiento mantenido de la producción de pescado y la mejora de los canales de distribución, el suministro mundial de alimentos pesqueros ha aumentado considerablemente en las cinco últimas décadas, con una tasa de crecimiento anual que supera el índice de crecimiento de la población mundial. El suministro mundial de peces comestibles *per capita* ha seguido aumentando año tras año (aprox., 18,6 kg *per capita* en 2010). Una parte considerable del pescado que se consume en países desarrollados corresponde a importaciones y, debido a la demanda constante y a la disminución de la producción pesquera nacional, se prevé que su dependencia de las importaciones, en particular procedentes de países en vías de desarrollo, aumente en los próximos años.

Tabla II.2. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura^a en el mundo.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011 ^b
Millones de toneladas						
Producción						
Pesca de captura						
Continental	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	11,5
Marítima	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
Pesca de captura total	90,0	90,3	89,7	89,6	88,6	90,4
Acuicultura						
Continental	31,3	33,4	36,0	38,1	41,7	44,3
Marítima	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
Acuicultura total	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	63,6
Producción pesquera mundial total	137,3	140,2	142,6	145,3	148,5	154,0
Utilización						
Consumo	114,3	117,3	119,7	123,6	128,3	130,8
Usos no alimentarios	23,0	23,0	22,9	21,8	20,2	23,2
Población (miles de millones)	6,6	6,7	6,7	6,8	6,9	7,0
Suministro <i>per capita</i> de pescado comestible (kg)	17,4	17,8	17,8	18,1	18,6	18,8

^aNo se contabilizan las plantas acuáticas. ^bLas cifras para 2011 son cálculos provisionales. Fuente: FAO (2012).

El pescado y los productos pesqueros representan una fuente muy valiosa de proteínas y nutrientes esenciales para tener una nutrición equilibrada y disfrutar de una buena salud. En el ámbito mundial, el pescado proporciona a unos 3000 millones de personas cerca del 20% de su aporte de proteínas animales y a otros 4300 millones de personas en torno al 15% de dichas proteínas. Existen claras diferencias entre los países desarrollados y los países en vías de desarrollo en lo que respecta a la contribución del pescado

en el aporte de proteínas animales; sin embargo, tanto en los países en vías de desarrollo como desarrollados, el nivel de consumo de pescado ha disminuido ligeramente en los últimos años al haber aumentado con mayor rapidez el consumo de otras proteínas animales.

II.1.3.2. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCA DE CAPTURA (MARINA Y CONTINENTAL)

El total de la producción mundial de la pesca de captura sigue manteniéndose estable en torno a los 90 millones de tm (Tabla II.2), y aunque se han producido algunos cambios notables en las tendencias de las capturas por país, zona pesquera y especies, la suma de todas las fluctuaciones anuales ha tenido un valor casi nulo en los últimos años.

II.1.3.2.1. Producción mundial de la pesca de captura marina

En los últimos años (2009–2010) importantes países pesqueros mostraron tendencias a la baja en el total de capturas marinas, entre los que se encuentran Perú y Chile (como consecuencia de la disminución de las capturas de anchoveta), Argentina, Canadá y México en el continente americano, Japón, la República de Corea y Tailandia en Asia; Islandia en Europa, y, en menor medida, Nueva Zelanda en Oceanía. Pese a registrar tendencias variables, Marruecos, Sudáfrica y Senegal mantuvieron su posición como los tres principales productores marinos de África.

Las áreas principales de pesca según la FAO se muestran en la Fig. 2.2 y en la Tabla II.3. El Pacífico noroeste (zona 61) sigue siendo con mucho la zona pesquera más productiva. Los niveles máximos de capturas en las zonas pesqueras templadas del Atlántico noroeste (zona 21), el Atlántico nordeste (zona 27) y el Pacífico nordeste (zona 67) se alcanzaron hace muchos años (en 1968, 1976 y 1987, respectivamente) y la producción total disminuyó de forma continuada desde principios y mediados de la década de 2000, aunque esta tendencia se invirtió en las tres zonas en el año 2010.

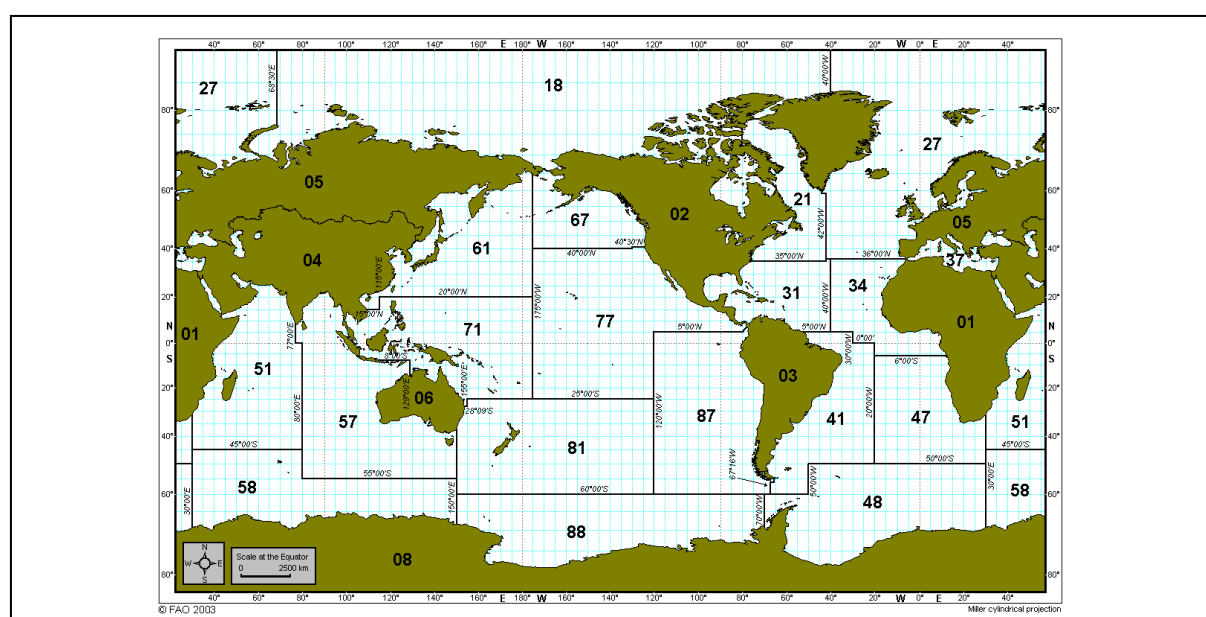


Figura 2.2. Áreas principales de pesca según la FAO.

Tabla II.3. Lista de las áreas principales de pesca según la FAO.

Código ^a	Área principal de pesca	Código ^a	Área principal de pesca	km ²	%
Aguas continentales		Áreas marítimas		360,900,000	100
01	África	Océano Atlántico y mares adyacentes			
02	América del norte	18	Mar Ártico	9,300,000	2.6
03	América del sur	21	Atlántico noroeste	6,300,000	1.7
04	Asia	27	Atlántico nordeste	14,400,000	4.0
05	Europa	31	Atlántico centro-occidental	14,500,000	4.0
06	Oceanía	34	Atlántico centro-oriental	14,100,000	3.9
07	Antigua URSS	37	Mediterráneo y Mar Negro	3,000,000	0.8
08	Antártida	41	Atlántico sudoccidental	17,500,000	4.8
		47	Atlántico sudoriental	18,300,000	5.1
		Océano Índico			
		51	Océano Índico occidental	29,300,000	8.1
		57	Océano Índico oriental	31,100,000	8.6
		Océano Pacífico			
		61	Pacífico noroeste	21,500,000	6.0
		67	Pacífico nordeste	7,600,000	2.1
		71	Pacífico centro-occidental	33,300,000	9.2
		77	Pacífico centro-oriental	48,100,000	13.3
		81	Pacífico sudoccidental	27,700,000	7.7
		87	Pacífico suroriental	30,800,000	8.5
		Océano Austral			
		48	Atlántico Antártico	11,800,000	3.3
		58	Océano Índico Antártico	12,700,000	3.5
		88	Pacífico Antártico	9,600,000	2.7

^aVer mapa de la Fig. 2.2.

Por lo que respecta a las zonas principalmente tropicales, el total de capturas aumentó en el Océano Índico occidental y oriental (zonas 51 y 57, respectivamente) y en el Pacífico centro-occidental (zona 71) y, en los dos últimos, se alcanzó un nuevo nivel máximo en el año 2010. Por el contrario, en el Atlántico centro-occidental (zona 31) la producción se redujo en 2010, debido a que EE.UU. disminuyó sus capturas, lo que podría atribuirse en gran medida al vertido de petróleo en el Golfo de México. Desde 1978, el Pacífico centro-oriental (zona 77) ha mostrado una serie de fluctuaciones en la producción de pesca de captura con un ciclo de unos 5 a 9 años. El último nivel máximo se registró en 2009 y podría haberse iniciado una fase de regresión en 2010.

Tanto el Mediterráneo y mar Negro (zona 37) como el Atlántico sudoccidental (zona 41) parecen ser zonas en las que la pesca atraviesa problemas ya que, desde 2007, el total de capturas ha disminuido un 15 y un 30%, respectivamente. En las dos zonas a lo largo de la parte sudoccidental de América y África se producen fenómenos de afloramiento, aunque su intensidad varía considerablemente cada año. En 2010, las capturas en el Pacífico sudoriental (zona 87), sin incluir la anchoveta, disminuyeron, mientras

que en el Atlántico sudoriental (zona 47) aumentaron, pero el examen de las tendencias históricas desde un período anterior revela claras trayectorias descendentes en ambas zonas.

Finalmente, en el Atlántico centro-oriental (zona 34) la producción ha aumentado en los tres últimos años; sin embargo, en esta zona las capturas totales están considerablemente influenciadas por las actividades de las flotas que faenan en aguas distantes y por el hecho de si únicamente los estados de pabellón notifican sus capturas o si se complementan también con información facilitada por algunos países costeros que registran las capturas de flotas extranjeras en sus Zonas Económicas Exclusivas (ZEE)⁶.

Como se desprende de diversos estudios (Soutar e Isaacs, 1974; Gulland, 1982; Hutchings y Baum, 2005) las poblaciones de peces presentan grandes fluctuaciones, incluso en ausencia de pesca. Aunque en el caso de algunas especies se conocen bien las causas (*e.g.*, en la anchoveta las fluctuaciones están determinadas por los cambios en los regímenes ambientales), para muchas otras especies estas causas siguen sin conocerse.

Dentro de la lista de las diez especies más capturadas, el cambio más evidente es la desaparición del jurel chileno (*Trachurus murphyi*), que en 2008 ocupaba el sexto lugar. Esta especie es un recurso transfronterizo con una distribución muy amplia en el Pacífico Sur, que abarca desde las ZEE nacionales hasta alta mar. Por otra parte, el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) ha regresado a la lista y se situó en el décimo puesto en 2010, posición que no alcanzaba desde 1998. De hecho, en 2010, todo el grupo de especies gadiformes (bacalao, merluza, eglefino, etc.) invirtió la tendencia negativa de los tres últimos años en los que había disminuido su captura.

Las capturas de otros importantes grupos de especies comerciales, como los atunes y los camarones, se mantuvieron estables en 2010. Las capturas sumamente variables de cefalópodos reanudaron su crecimiento tras una disminución en 2009 y en las zonas antárticas, se retomó el interés por la pesca de krill y se registró un aumento de las capturas de más del 70% en 2010. De los cuatro grupos de bivalvos marinos, las almejas y berberechos, que a principios de la década de 1990 contribuyeron a más de la mitad de las capturas globales de bivalvos, han aumentado recientemente su ritmo de descenso. En 2009–2010, se vieron ampliamente superados por las vieiras, que a diferencia de éstos mostraron una tendencia ascendente desde finales de la década de 1990. La producción de mejillones y ostras, no ha variado mucho con los años, pero puede observarse una tendencia general a la baja.

II.1.3.2.2 Producción mundial de la pesca de captura continental

El total de la producción mundial de la pesca de captura en aguas continentales ha aumentado espectacularmente desde mediados de la década de 2000. Se estima que la producción total ascendió a 11,2 millones de tm en 2010 (Tabla II.2). Pese a este crecimiento, sigue afirmándose que la producción

⁶ La ZEE es un área situada más allá del mar territorial y adyacente a éste, que se extiende 200 millas náuticas desde las líneas de base rectas a partir de las cuales se mide la anchura del mar territorial (Artículos 55 y 57 de la Tercera Convención sobre el Derecho del Mar, ONU).

mundial es mucho mayor, pues algunos estudios han apuntado a que las capturas en aguas continentales se subestiman notablemente en algunas regiones (Coates, 2002; Kolding y van Zwieten, 2006). Por otra parte, se considera que las aguas continentales son objeto de una pesca excesiva en muchas partes del mundo, y la presión humana y los cambios en las condiciones ambientales han deteriorado gravemente importantes masas de agua dulce (*e.g.*, el Mar de Aral y el Lago Chad). Además, en varios países que revisten importancia en cuanto a la pesca en aguas continentales (*e.g.*, China), una buena parte de las capturas continentales procede de masas de agua que se repueblan de forma artificial y se encuentran bajo estrecha vigilancia, por lo que es probable que la producción se registre de forma bastante minuciosa. Así pues, tanto las mejoras en la cobertura estadística como las actividades de repoblación pueden contribuir al aparente incremento de la producción pesquera continental.

Más de la mitad de las capturas mundiales en aguas continentales siguen notificándose como “capturas no identificadas por especie”; sin embargo, en los últimos años, varios países han realizado esfuerzos por mejorar la calidad de sus estadísticas sobre capturas continentales y recopilar datos desglosados por especie de forma más detallada.

II.1.3.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCADO PROCEDENTE DE LA ACUICULTURA

En el transcurso de medio siglo aproximadamente, la acuicultura ha pasado de ser casi insignificante a equipararse a la producción de la pesca de captura en cuanto a su contribución a la alimentación de la población en el mundo. Este sector también ha evolucionado respecto a innovación tecnológica y ha sufrido una adaptación para satisfacer las necesidades cambiantes del consumidor. La producción acuícola mundial ha seguido creciendo en el nuevo milenio, aunque más lentamente que en los decenios de 1980 y 1990, alcanzándose un nivel máximo sin precedentes en 2010 (aprox., 60 millones de tm, excluyendo las plantas acuáticas y los productos no alimentarios) (Tabla II.2).

Actualmente, se crían unas 600 especies acuáticas en cautividad en todo el mundo en diversos sistemas e instalaciones de cultivo de diferentes grados de utilización de insumos y complejidad tecnológica, empleando agua dulce, salobre y marina. Asimismo, la acuicultura contribuye notablemente a la producción de la pesca de captura basada en el cultivo, en particular en las aguas continentales, gracias al material de repoblación producido en viveros; sin embargo, sigue habiendo un desequilibrio en todas las regiones respecto a la etapa de desarrollo y la distribución de la producción acuícola. Algunos países en vías de desarrollo de Asia y el Pacífico, África subsahariana y América del Sur se están convirtiendo en productores importantes en sus respectivas regiones.

II.1.3.3.1. Producción de pescado y productos de la pesca para consumo humano

La cría de especies comestibles incluye peces de escama, crustáceos, moluscos, anfibios (ranas), reptiles acuáticos (excepto cocodrilos) y otros animales acuáticos (como cohombres de mar, erizos, ascidias y medusas). En 2010, la producción mundial de cultivo de especies acuáticas comestibles fue de 59,9 millones de tm (Tabla II.2), lo que supuso un aumento del 7,5 % con respecto a 2009.

Desde mediados del decenio de 1990, la acuicultura ha sido el motor de crecimiento de la producción pesquera total, puesto que, como se ha mencionado, la producción mundial de la pesca de captura se ha estabilizado. Su contribución a la producción pesquera mundial total aumentó constantemente en este periodo y su contribución a la producción mundial de especies comestibles fue del 47% en 2010 en comparación con solo el 9% en 1980. La tasa de crecimiento de la producción de especies comestibles cultivadas en el período comprendido entre 1980 y 2010 fue muy superior a la tasa de crecimiento de la población mundial (1,5%); por consiguiente, el consumo medio anual *per capita* de especies cultivadas aumentó casi siete veces, pasando de 1,1 kg en 1980 a 8,7 kg en 2010.

La producción acuícola mundial es vulnerable a los efectos socioeconómicos, ambientales, tecnológicos y de origen natural adversos. Por ejemplo, la acuicultura marina en jaulas de salmón del Atlántico en Chile, el cultivo de ostras en Europa (principalmente en Francia) y la cría de camarón marino en varios países de Asia, América del Sur y África han registrado una alta mortalidad debido a los brotes de enfermedades en los últimos años, con las consiguientes pérdidas de la producción. Los países expuestos a desastres naturales se ven muy afectados por los daños o las pérdidas causadas por inundaciones, la sequía, tormentas tropicales y, con menor frecuencia, terremotos. La contaminación del agua amenaza cada vez más a la producción en algunas zonas de reciente industrialización y rápida urbanización. Así, en 2010, la acuicultura en China sufrió importantes pérdidas de producción causadas por enfermedades, desastres naturales, contaminación, etc., mientras que en 2011, los brotes de enfermedades acabaron prácticamente con la producción de cría de camarón marino en Mozambique.

II.1.3.3.2. Especies producidas en acuicultura

En 2010, la composición de la producción acuícola mundial (Tabla II.2) fue la siguiente (Fig. 2.3): peces de agua dulce (56,4%), moluscos (23,6%), crustáceos (9,6%), peces diádmicos (6,0%), peces marinos (3,1%) y otros animales acuáticos (1,4%). Conviene destacar que la producción acuícola supera a la producción de la pesca de captura respecto a muchas de las especies básicas de la acuicultura. Por ejemplo, las capturas de peces silvestres representan menos del 1% de la producción de salmón del Atlántico, y la cría de camarones marinos contribuye un 55% a la producción mundial total.

Desde comienzos del decenio de 1990, más de la mitad de la producción mundial de peces diádmicos fue de salmónidos, alcanzando un nivel máximo en 2001, antes de disminuir ligeramente frente al aumento de la producción de chano en Asia. La producción de anguilas del Japón y Europa, criadas en su mayoría en el este de Asia y en menor medida en Europa, se ha mantenido en los últimos años. La cría de esturiones, para la obtención de carne y caviar, ha aumentado constantemente en Asia, Europa y América, aunque la producción es todavía pequeña. En algunos países se han creado más sistemas de cría con equipos sofisticados que requieren una elevada inversión para la producción de caviar.

La producción mundial de peces marinos está distribuida de forma más homogénea entre las especies cultivadas. Sin embargo, casi medio millón de tm, es decir, una cuarta parte de la producción mundial, se notifican sin identificar a las especies, sobre todo por parte de algunos de los principales

productores de Asia. Hay pruebas de que la producción reportada de lubina y dorada ha sido significativamente inferior a la cifra real en algunas zonas del Mediterráneo.

La producción acuícola mundial de crustáceos en 2010 consistía en especies de agua dulce (29,4%) y marinas (70,6%). Dentro de estas últimas predomina el camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*); las principales especies de agua dulce incluyen cangrejo de las marismas, cangrejo chino, camarón oriental y camarón gigante. En cuanto a los moluscos, la producción acuícola de almejas y berberechos se ha incrementado mucho más rápido que la de otras especies. En 1990, la producción de almejas y berberechos fue la mitad de la producción de ostras, pero en 2008 superó a éstas pasando a ser el grupo más producido de especies de moluscos. Entre los animales acuáticos, la producción de cohombros de mar y tortugas de caparazón blando se ha incrementado rápidamente.

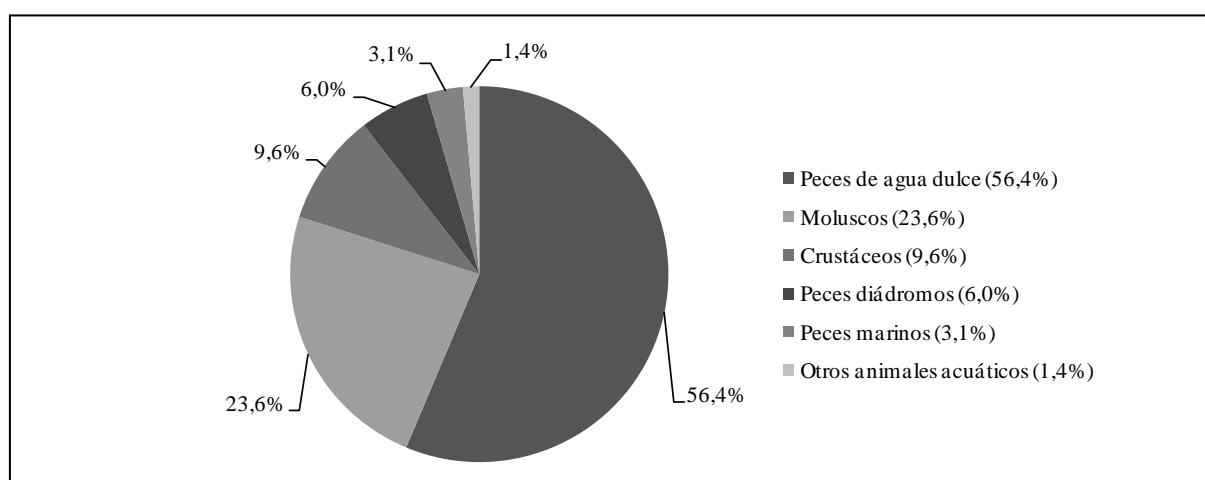


Figura 2.3. Composición de la producción acuícola mundial. Fuente: FAO (2012).

II.1.4. LA PESCA EN ESPAÑA

En nuestro país, la actividad pesquera goza de una gran tradición, siendo la flota española una de las más importantes del mundo con un sector dinámico que contribuye de manera importante a la economía nacional. Como consecuencia de la importancia de la pesca en los ámbitos sociales y económicos del país, la presencia del pescado en la dieta de los españoles resulta abundante y frecuente, lo que supone un aporte fundamental de proteínas. Para poder abastecer esta demanda, se recurre a tres fuentes principales: la pesca extractiva o marina, la producción de la acuicultura nacional y las importaciones, procedentes tanto de los países de la UE como de terceros. Conviene destacar que la elevada demanda de pescado en España desde tiempos remotos puso de manifiesto la insuficiencia de la producción pesquera del caladero nacional y propició el desarrollo de pesquería en aguas exteriores y caladeros lejanos.

II.1.4.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SECTOR PESQUERO ESPAÑOL

La Ley 3/2001, de 26 de marzo, de Pesca Marítima del Estado, hace referencia en su exposición de motivos a que la importancia económica y social del sector pesquero español no puede estimarse únicamente teniendo en cuenta la actividad estrictamente extractiva, ya que las especiales características de la actividad le confieren un efecto multiplicador extraordinario. Por lo tanto, se puede afirmar, según esta Ley, que lo que genéricamente se conoce como sector económico pesquero es un conglomerado de actividades íntimamente relacionadas que, basadas en la explotación y el aprovechamiento de los recursos marinos y acuícolas vivos, abarca actividades como la pesca extractiva, la acuicultura, la comercialización y la transformación de los productos, la construcción naval, la industria auxiliar y los servicios relacionados, que configuran un conjunto económico y social inseparable (MARM, 2009).

La importancia de los sectores de la pesca extractiva y la acuicultura en lo que se refiere a su contribución al Producto Interior Bruto (PIB) nacional se sitúa en el 0,2%, cifra que asciende al 1% si también se incluyen los subsectores de la transformación y la comercialización, y al 10% si el cálculo se circunscribe solamente a las denominadas zonas altamente dependientes de la pesca. En estas zonas, la importancia de la actividad pesquera es mucho mayor ya que la tasa de empleo depende en gran medida del sector extractivo y, según los casos, de la acuicultura y sus actividades conexas (MARM, 2009, 2011a). En lo que se refiere a la importancia de las diferentes regiones, hay que destacar que, aunque todas las Comunidades Autónomas (CC.AA.) con litoral tienen intereses en el sector pesquero, destaca de manera muy especial Galicia, seguida de Andalucía, País Vasco y Canarias (MARM, 2009, 2011a).

II.1.4.2. PESCA MARINA O EXTRACTIVA

La aportación de la pesca extractiva a la oferta de pescado en España se ha venido reduciendo en los últimos años como consecuencia, entre otras causas, de las políticas de reducción de capacidad, la situación de sobreexplotación y el incremento de los costes de explotación, en especial, los combustibles (MAPA, 2007).

La flota española constituye la mayor flota de la UE en términos de tonelaje bruto. La flota, registrada en el *Censo de la Flota Pesquera Operativa* (CFPO), estaba compuesta en 2010 por un total de 10.847 buques, de los que aproximadamente el 96% faenaron en caladeros nacionales y el resto en caladeros no españoles (MARM, 2011b; Castro *et al.*, 2011). Con respecto a la distribución de la flota por CC.AA., las que poseen mayor número de embarcaciones son Galicia, Andalucía y Cataluña. En los últimos años, la flota española ha ido ajustándose a las necesidades y las directrices comunitarias, lo que ha supuesto que, desde 2005, se haya reducido un 21%. Esta disminución se debe principalmente al compromiso adquirido por el Estado Español para reducir el esfuerzo pesquero, siguiendo las directrices propuestas por la PPC. Este objetivo se ha conseguido por la puesta en marcha de los Planes de Ajuste del Esfuerzo Pesquero, medida contemplada en el Reglamento (CE) nº 1198/2006, del Consejo de 27 de julio de 2006, relativo al Fondo Europeo de Pesca. Conviene destacar que la flota española faena en todos los océanos del globo, siendo el Atlántico su mayor caladero, seguido por los caladeros del

Mediterráneo. Las principales especies comercializadas en fresco por comunidad autónoma se recogen en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Principales especies de pesca extractiva comercializadas en fresco.

Pesca extractiva		
Andalucía	Asturias	Baleares
Especies	Especies	Especies
Gamba de altura (<i>Parapenaeus longirostris</i>)	Merluza	Gamba rosada
Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)	Atún blanco (<i>Thunnus alalunga</i>)	Langosta común (<i>Palinurus elephas</i>)
Chirla (<i>Venus gallina</i>)	Caballa (<i>Scomber scombrus</i>)	Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>)
Boquerón (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Pez de San Pedro (<i>Zeus faber</i>)
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Rape (<i>Lophius piscatorius</i>)	Cabracho (<i>Scorpaena scrofa</i>)
Merluza de Senegal (<i>Merluccius senegalensis</i>)	Percebe (<i>Pollicipes pollicipes</i>)	Cigala
Pulpo (<i>Octopus</i> spp.)	Salmonete de roca (<i>Mullus surmuletus</i>)	Salmonete de roca
Merluza (<i>Merluccius merluccius</i>)	Sardina	Chanquete (<i>Aphia minuta</i>)
Cigala (<i>Nephrops norvegicus</i>)	Congrio (<i>Conger conger</i>)	Merluza
Gamba rosada (<i>Aristeus antennatus</i>)	Rape (<i>Lophius</i> spp.)	Lampuga (<i>Coryphaena hippurus</i>)
Canarias	Cantabria	Cataluña
Especies	Especies	Especies
Patudo (<i>Thunnus obesus</i>)	Caballa	Gamba rosada
Listado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Atún blanco	Merluza
Sama de pluma (<i>Dentex gibbosus</i>)	Estornino	Boquerón
Loro viejo (<i>Sparisoma cretense</i>)	Rape	Sardina
Estornino (<i>Scomber japonicus</i>)	Merluza	Cigala
Chopa (<i>Spondyliosoma cantharus</i>)	Jurel (<i>Trachurus</i> spp.)	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
Pargo (<i>Pagrus pagrus</i>)	Sardina	Pulpo
Burro chiclero (<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>)	Gallo (<i>Lepidorhombus</i> spp.)	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Chacarona de Canarias (<i>Dentex canariensis</i>)	Salmonete (<i>Mullus</i> spp.)	Sepia común (<i>Sepia officinalis</i>)
Sama marroquí (<i>Dentex maroccanus</i>)	Rape negro (<i>Lophius budegasa</i>)	
Galicia	Murcia	País Vasco
Especies	Especies	Especies
Merluza	Gamba rosada	Merluza
Gallo	Pez espada (<i>Xiphias gladius</i>)	Atún blanco
Jurel	Merluza	Caballa
Rape negro	Dorada	Atún rojo (<i>Thunnus thynnus</i>)
Almeja fina (<i>Ruditapes decussatus</i>)	Salmonete	Rape negro
Almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	Melva (<i>Auxis rochei rochei</i>)	Gallo
Berberecho (<i>Cerastoderma edule</i>)	Pez de limón (<i>Seriola dumerili</i>)	Rape
Almeja japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Langostino (<i>Melicertus kerathurus</i>)	Congrio
Sardina	Pulpo	Calamar
Bacaladilla		
Valencia		
Especies		
Merluza		
Boquerón		
Gamba rosada		
Sardina		
Cigala		
Salmonete		
Pulpo		
Dorada		
Sepia común		
Gamba de altura		

Fuente: MARM (2011b).

El empleo que genera el sector extractivo en España ha ido descendiendo en los últimos años hasta reducirse en cerca de un 20% respecto al año 2005, lo que puede deberse a varios factores. Por una parte, podría influir la política de diversificación social unida a la de ajuste del esfuerzo pesquero, y, por otra, la

separación, desde 2007, en los registros del Instituto Social de la Marina (ISM) de los empleos que provienen de la acuicultura y de los procedentes de la pesca extractiva (MARM, 2011b). A este respecto, del total de trabajadores españoles dedicados al sector extractivo, más de la mitad se encuentran en Galicia, y del 50% restante, el 16% se concentra en Andalucía y el otro 34% se distribuye prácticamente por igual por todo el litoral español (MARM, 2011b).

II.1.4.2.1. Caladeros

La jurisdicción permite diferenciar entre aguas nacionales españolas (caladero nacional), aguas de la UE y aguas libres o de terceros países (caladeros internacionales) (FAO, 2007; Castro *et al.*, 2011). El caladero nacional comprende las aguas bajo soberanía o jurisdicción españolas en el Atlántico y en el Mediterráneo, la ZEE del Atlántico y la Zona de protección pesquera del Mediterráneo (MARM, 2007). Estas aguas son de escasa importancia debido a que la plataforma continental española es estrecha y las aguas son profundas a pocas millas de la costa. En el Atlántico se encuentran 200 m de profundidad a 15–30 millas de la costa; en el Mediterráneo la isobárica de 50 m se encuentra a una distancia media de 3 millas de la costa, mientras que en el archipiélago canario es prácticamente inexistente (MARM, 2007). Debido a esta circunstancia, la pesca costera o de litoral se lleva a cabo a pocas horas de navegación del puerto base y la duración de la mareas no suele superar las 24 h en el Atlántico y las 12 h en el Mediterráneo. El caladero nacional se subdivide a su vez en otros cuatro caladeros: (i) Cantábrico y Noroeste, que comprende las aguas de soberanía y jurisdicción españolas que se extienden desde la frontera con Francia, en la desembocadura del Bidasoa, hasta la frontera con Portugal en la desembocadura del río Miño; (ii) Golfo de Cádiz, constituido por las aguas de soberanía y jurisdicción españolas que se extienden entre el meridiano de Punta marroquí en las proximidades de Tarifa y la frontera con Portugal en la desembocadura del Guadiana; (iii) Mediterráneo, representado tanto por las aguas españolas como por las internacionales de dicho mar situadas al este del meridiano de Punta Marroquí, incluyendo las islas Baleares, la isla de Alborán y la zona de protección pesquera del Mediterráneo), y (iv) Canarias, que comprende las aguas de soberanía y jurisdicción españolas que circundan al archipiélago canario.

El actual régimen de acceso de flotas españolas a aguas comunitarias quedó determinado en el *Acta de Adhesión del Reino de España y la República de Portugal a las Comunidades Europeas* en 1986, donde se establecieron tres caladeros diferentes: (i) aguas comunitarias occidentales (ZEE occidentales de Reino Unido, Irlanda y Francia); (ii) Golfo de Vizcaya (ZEE occidental de Francia), y (iii) aguas ibéricas no españolas (ZEE peninsular de Portugal) (Castro *et al.*, 2011). Así, en función del caladero en el que actúa, la flota pesquera española se puede clasificar en flota de gran altura, altura, costera y artesanal. La flota de gran altura está constituida por buques congeladores que faenan en caladeros internacionales muy alejados de las costas españolas y que suelen hacer mareas de larga duración, lo que determina que, en la mayor parte de los casos, sus desembarques no se realicen directamente en puerto español, sino en otros países con los que existe un acuerdo de pesca de la UE, o mediante transbordos a buques mercantes, aunque buena parte de las capturas tienen como destino el mercado español (FAO, 2002, 2007). En el caso de la flota de altura, que faena en aguas más alejadas de la costa o en países

cercanos y cuyas mareas pueden oscilar desde tres días a tres semanas, se constata una tendencia a realizar algunos desembarques en otros países. Así, por ejemplo, la flota que faena en caladeros del Gran Sol realiza desembarques en puertos del Reino Unido, Irlanda o Francia, la que faena en aguas de Portugal lo hace en puertos de ese país, etc. Pero, también en este caso, la mayor parte de las capturas son comercializadas en territorio español. Por el contrario, las flotas costera o de bajura y artesanal, realizan la totalidad de sus desembarcos en puertos españoles y, generalmente, en los puertos más cercanos del caladero en el que habitualmente pescan (FAO, 2002).

Por otra parte, los puertos españoles son receptores de las descargas de buques de pesca de otros países. Así, por ejemplo, el puerto de Vigo es el mayor receptor de desembarcos de pescado congelado, seguido del puerto de Las Palmas de Gran Canaria. En los puertos del País Vasco se producen desembarcos de flota francesa y las flotas británica o irlandesa realizan desembarcos cada vez más esporádicos en puertos de la cornisa cantábrica y noroeste. En los puertos continentales del Mediterráneo también realiza desembarcos de cierta importancia la flota francesa. No obstante, conviene señalar que cada vez en mayor medida las entradas de productos pesqueros se realizan a través de un aeropuerto (FAO, 2007).

II.1.4.2.2. Marisqueo

El marisqueo, modalidad de pesca consistente en la actividad extractiva dirigida a la captura de animales invertebrados, tiene gran repercusión, especialmente en las regiones del norte y suratlántico de España, y se desarrolla en dos modalidades, a pie y a flote. El marisqueo a pie se realiza en la zona marítimo-terrestre y en la parte de la zona marítima en la que pueda ejercerse la actividad marisquera sin necesidad de embarcación, mientras que el marisqueo a flote viene determinado por el uso de una embarcación auxiliar para el ejercicio de la actividad. El primero es llevado a cabo, en su práctica totalidad, por mujeres y el segundo principalmente por hombres. A pesar del descenso en el número de personas ocupadas en este subsector en los últimos años, del marisqueo dependen los ingresos de numerosas familias. En lo relativo al empleo, de nuevo, Galicia es la CC.AA. con más empleos dedicados al marisqueo seguida de lejos de Andalucía, Cantabria, Asturias y Cataluña. En cuanto a capturas, Galicia también produce las cifras más altas en tm de crustáceos y moluscos (MARM, 2011b).

II.1.4.2.3. Almadrabas

Merece citarse, igualmente, una actividad pesquera de gran tradición en nuestras pesquerías, como son las almadrabas, artes fijas de pesca destinados a la captura de atún rojo y otras especies (bonito, melva o pez espada). Esta modalidad de pesca se efectúa principalmente en la región suratlántica y en 2009 estaba constituida por una flota auxiliar de 124 buques, con una producción de atún rojo de aproximadamente 1.208 tm, con un valor comercial de 9,21 millones de euros (MARM, 2011b).

II.1.4.3. PESCA CONTINENTAL

En España, las aguas continentales se definen como los manantiales, charcas, lagunas, lagos, acequias, embalses, pantanos, canales, albuferas, arroyos y ríos, ya sean dulces, salobres o saladas; extendiéndose el límite de las aguas continentales hasta su desembocadura al mar, y entendiéndose por desembocadura del río, acequia o canal, la línea recta imaginaria que une los puntos de intersección de cada una de las orillas del curso o masa de agua con la línea natural de tierra con el mar en calma. Según la Constitución Española, son las CC.AA. las que pueden asumir las competencias en pesca fluvial, siendo normalmente las autoridades medioambientales las encargadas de esta gestión.

En las aguas continentales la pesca extractiva profesional es muy escasa y sólo se practica en ciertas partes del país. Por otra parte, está permitida de manera restrictiva la pesca recreativa de determinadas especies. Puede existir, en algunos casos, conflicto de competencias en las desembocaduras de los ríos, deltas, albuferas, estuarios, marismas, marjales o esteros, donde es difícil calcular la línea imaginaria que separa las competencias de unos y otros (MARM, 2009).

El caso de la Comunidad Valenciana es significativo debido a la albufera que se crea entre los márgenes de la ciudad de Valencia y la costa mediterránea. Desde siempre, la actividad pesquera ha estado ligada a esta zona costera, que cuenta con su propia cofradía de pescadores, El Palmar, dedicada a la pesca extractiva de lubina, angula, anguila, cangrejo americano y mújil o lisa. En Cataluña la situación es similar a la Comunidad Valenciana, ya que en el Delta del Ebro existe una cofradía de pescadores dedicada a la pesca con redes fijas de anguila, lubina y lisa. En cuanto a la vertiente cantábrica, la pesca en aguas continentales es recreativa en su totalidad, excepto en el caso de la pesca de angula, llevada a cabo en las desembocaduras de los ríos. En Galicia, normalmente la pesca profesional en los ríos no está permitida, aunque existen algunas excepciones, como la pesca de la lamprea en los ríos Ulla y Miño, con dos modalidades de arte. Por una parte, existen las "pesqueiras", de origen medieval, que consiste en pequeños diques con aberturas estrechas en los que se colocan una especie de nasas o "pesco", hacia las que las lampreas acaban siendo arrastradas por la corriente. La otra modalidad de captura, autorizada en el río Tea, consiste en unas empalizadas de madera sobre la que se colocan los pescadores que capturan las lampreas con "fisga" por la noche. En el caso del río Miño se trata de un caso más complejo ya que se trata de un tramo internacional, regido por una comisión de Límites entre España y Portugal. Hay licencias de pesca a flote para embarcaciones tanto españolas como portuguesas, con diversos artes de enmalle y nasas autorizadas (MARM, 2011b).

II.1.4.4. ACUICULTURA

La UE define la acuicultura como la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión. En España, la acuicultura es una actividad económica de suma importancia en determinadas zonas costeras. La mayor parte de la producción nacional de acuicultura total (marina y continental), un 79,8%, corresponde a moluscos (MARM, 2011b) (Fig. 2.4), destacando especialmente el

cultivo del mejillón en bateas, con unas cifras de producción que sitúan a España entre los principales productores de moluscos a nivel mundial. Galicia es la principal comunidad autónoma productora de esta especie acuícola, alcanzando un 98% del total nacional producido, seguida por Cataluña. Conviene señalar que la producción de mejillón experimenta bruscas variaciones en función de los episodios de mareas rojas que tienen lugar en las costas gallegas. También hay que destacar la importancia del cultivo de las almejas japónicas, babosas y finas, de las cuales la japónica es la más relevante, cultivada casi en su totalidad en parques gallegos. Por otra parte, la producción nacional de peces es el grupo de especies de mayor valor unitario, siendo Galicia la comunidad autónoma con mayor volumen respecto del total nacional, seguida por Andalucía, Comunidad Valenciana, Cataluña y la región de Murcia. Las principales especies de acuicultura marina comercializadas se encuentran recogidas en la Tabla II.5.

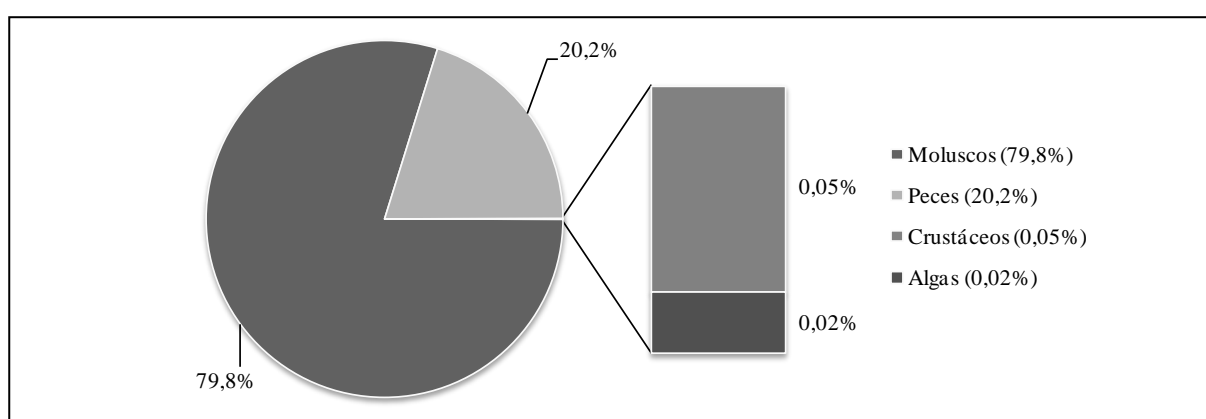


Figura 2.4. Producción acuícola en España. Fuente: MARM (2011b).

Al estudiar el reparto de producción por regiones se observa cómo en la cornisa Cantábrica y la región Noroeste se ha desarrollado el cultivo de especies de agua fría, principalmente moluscos (mejillón y ostras en bateas, y almejas y berberechos en parques de cultivo) y rodaballo. El cultivo del rodaballo se lleva a cabo en instalaciones en tierra, con aporte de agua de mar oceánica. Como cultivos secundarios destacan los pectínidos y, de forma emergente, el pulpo, besugo, abadejo y lenguado. La comunidad autónoma que centra la casi totalidad de estos cultivos es Galicia. En la zona Mediterránea y Suratlántica, de aguas más templadas, se desarrolla la producción de lubina y dorada, generalmente en sistemas de jaulas flotantes, lo que provoca que la producción de acuicultura marina sea más controlada e intensiva. Cataluña y Andalucía son las CC.AA. que lideran la acuicultura en estas regiones, si bien hay que destacar el engorde de atún rojo en jaulas en la región murciana, y la corvina, que se está convirtiendo en una especie de gran importancia en esta región. También tiene cierta importancia en estas zonas el cultivo de otras especies como la ostra, la almeja y el mejillón. En Canarias y Baleares, se ha desarrollado fuertemente en los últimos años el cultivo en jaulas flotantes debido a unas condiciones oceanográficas muy favorables, que permiten la cría de lubina y dorada.

Tabla II.5. Producción de las principales especies comerciales en la acuicultura marina.

Acuicultura marina		
Andalucía		Asturias
Peces	Crustáceos	Bivalvos
Anguila europea (marina) (<i>Anguilla anguilla</i>)	Cangrejo de río (<i>Carcinus maenas</i>)	Ostión japonés
Atún rojo (<i>Thunnus thunnus</i>)	Camarón (<i>Palaemonetes varians</i>)	
Baila (<i>Dicentrarchus punctatus</i>)	Camarón común (<i>Palaemon serratus</i>)	
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Langostino (<i>Melicertus kerathurus</i>)	
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Langostino japonés (<i>Penaeus japonicus</i>)	
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)		Baleares
Lisas, mágiles (<i>Mugil spp.</i>)	Bivalvos	Bivalvos
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)		
	Almeja fina (<i>Ruditapes decussatus</i>)	Escupiña grabada (<i>Venus verrucosa</i>)
Pez de limón (<i>Seriola dumerili</i>)	Almeja japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Mejillón
Sargo (<i>Diplodus sargus</i>)	Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	
Cefalópodos	Ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>)	
Pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>)	Zamburiña (<i>Chlamys varia</i>)	
Sepia común (<i>Sepia officinalis</i>)		
Cataluña		Canarias
Peces	Bivalvos	Peces
Atún rojo	Almeja fina	Dorada
Dorada	Almeja japonesa	Lubina
Lubina	Berberecho (<i>Cerastoderma edule</i>)	
	Mejillón	
	Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>)	
	Ostión japonés	
	Ostra europea (<i>Ostrea edulis</i>)	
Galicia		Cantabria
Peces	Bivalvos	Peces
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	Rodaballo
Lenguado común (<i>Solea solea</i>)	Almeja fina	
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Almeja japonesa	Bivalvos
Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Berberecho	Ostión japonés
	Mejillón	
Cefalópodos	Ostión japonés	
Pulpo común	Ostra europea	
	Volandeira (<i>Aequipecten opercularis</i>)	
Valencia		Murcia
Peces	Bivalvos	Peces
Anguila europea (marina)	Mejillón	Atún rojo
Corvina	Ostra europea	Corvina
Dorada	Zamburiña	Dorada
Lubina		Lubina

Fuente: MARM (2011b)

En lo que se refiere a la acuicultura continental, el elevado desarrollo de estos cultivos se basa principalmente en la alta calidad de los recursos acuáticos existentes, siendo la trucha arcoíris la especie protagonista con 15.000 tm para consumo. Esta especie se cultiva en 11 CC.AA., siendo Galicia y Cataluña las que concentran más de la mitad de la producción nacional. Otras especies de acuicultura continental son la tenca, la anguila y el esturión (Tabla II.6).

Tabla II.6. Producción de las principales especies comerciales en la acuicultura continental.

Acuicultura continental		
Andalucía	Aragón	Asturias
Peces	Peces	Peces
Esturión (<i>Acipenser naccarii</i>)	Esturión	Trucha arcoíris
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Trucha arcoíris	
	Trucha común/marina (<i>Salmo trutta</i>)	
Baleares	País Vasco	Cataluña
Peces	Peces	Peces
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Anguila europea (continental) (<i>Anguilla anguilla</i>)	Esturión
Tenca (<i>Tinca tinca</i>)	Trucha arcoíris	Trucha arcoíris
Galicia	Castilla y León	Valencia
Peces	Peces	Peces
Trucha arcoíris	Trucha arcoíris	Trucha arcoíris
Navarra	Tenca	La Rioja
Peces	Crustáceos	Peces
Trucha arcoíris	Cangrejo señal (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Trucha arcoíris
Extremadura		Castilla-La Mancha
Peces		Peces
Tenca		Trucha arcoíris

Fuente: MARM (2011b)

Los datos de producción de acuicultura dan una idea del volumen económico que genera esta actividad, siendo un importante motor de desarrollo para las zonas costeras altamente dependientes de la pesca y constituyendo, por tanto, una importante fuente de empleo alternativo. Este sector cuenta con un importante capital humano de profesionales altamente cualificados, operarios, técnicos y personal científico especializado que está posibilitando la expansión de la acuicultura a través de la consolidación de los cultivos existentes y el continuo desarrollo de nuevas investigaciones y tecnologías, lo que sitúa a la acuicultura española como punta de lanza de la investigación y desarrollo a nivel mundial en este campo.

II.1.4.5. TRANSFORMACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

La transformación y comercialización de los productos pesqueros desempeña una función de gran relevancia, no sólo en la elaboración de alimentos sanos y nutritivos, sino también como parte fundamental de la actividad pesquera en términos socioeconómicos, de creación de valor añadido y como medio de vida en las zonas costeras. La industria transformadora de pescado en España es muy diversa y abarca una amplia gama de productos y especies que van desde productos congelados (e.g., merluza y bacalao), pasando por conservas (e.g., atún y mejillón) o productos cocidos (e.g., langostino y gamba), hasta productos ahumados (e.g., salmón y trucha), salados (e.g., bacalao y arenque) y platos preparados o semipreparados (MARM, 2011b). El sector comercializador de productos pesqueros integra gran cantidad de agentes y operaciones variadas con el objetivo común de suministrar productos pesqueros al consumidor. En este proceso de comercialización se incluyen las personas y empresas que intervienen en

la transferencia del producto pesquero desde el productor al consumidor final como son los agentes mayoristas exportadores y de mercados centrales, los detallistas y la distribución comercial. En el año 2009, este sector generó en España cerca de 998 millones de euros de productos en primera venta, siendo las principales especies comercializadas merluza europea, sardina, gamba rosada, gallo, boquerón, atún blanco, rape negro, caballa del Atlántico, jurel y gamba de altura (MARM, 2011b). En el ámbito autonómico, Galicia fue la comunidad con mayor valor de producto comercializado (32%), seguida de Andalucía (17%), País Vasco (15%) y Cataluña (13%) (Fig. 2.5).

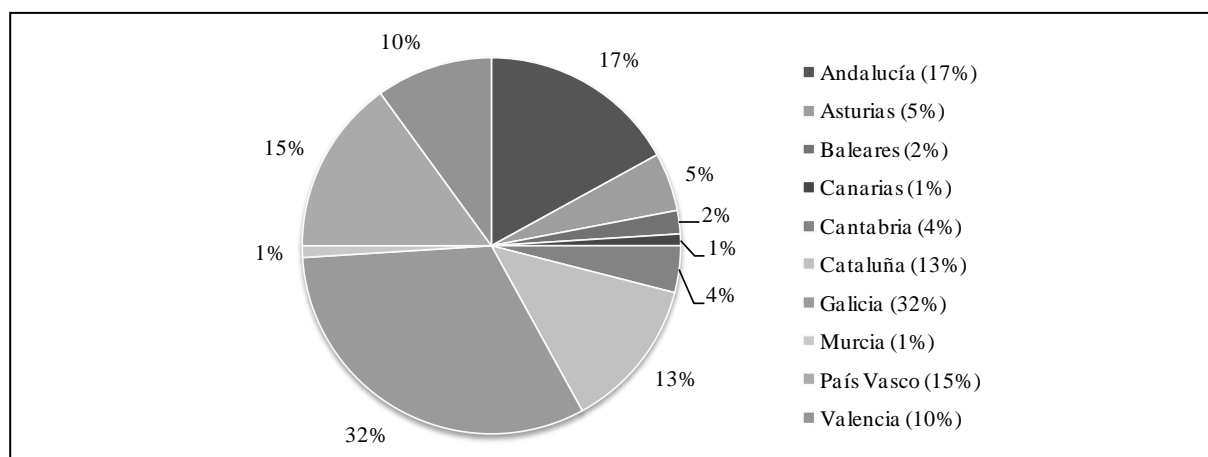
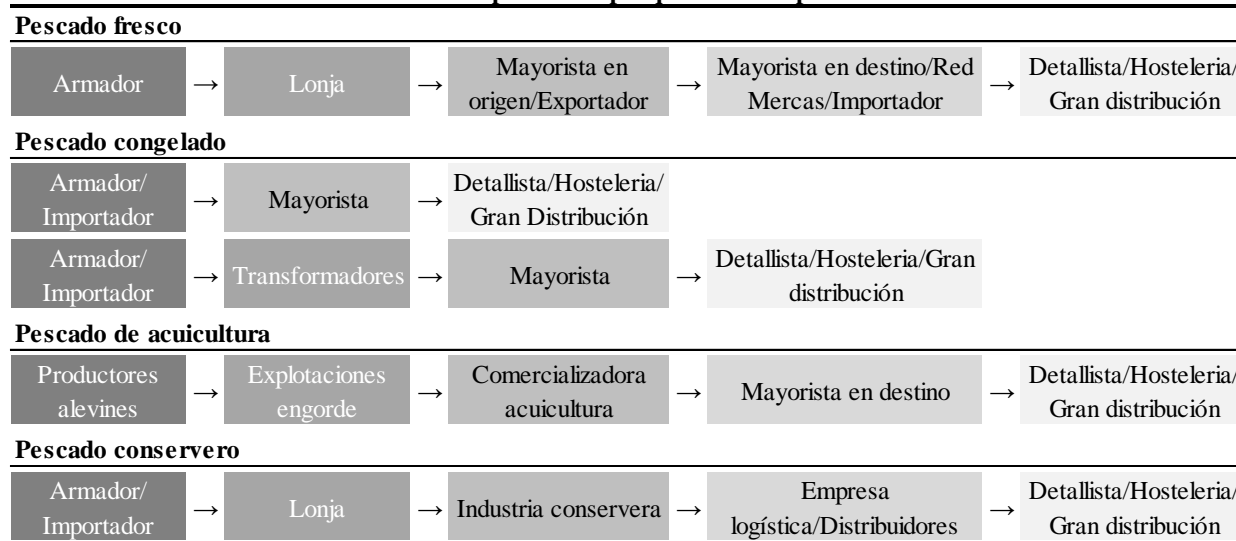


Figura 2.5. Valor del producto comercializado (%) en España por Comunidades Autónomas. Fuente: MARM (2011b).

La distribución del pescado depende de factores como su presentación en la primera venta (extractiva en fresco, en congelado, acuicultura y productos de la industria conservera) y del número de agentes que intervienen en los distintos canales de comercialización. Considerando estos factores, los canales de comercialización de productos pesqueros existentes en España se recogen en la Tabla II.7. En primer lugar se encuentran los mercados en origen que son establecimientos autorizados donde se realiza, además de un control sanitario y estadístico, la exposición y primera venta de los productos pesqueros frescos. La mayoría de los mercados en origen son las lonjas, situadas en los recintos portuarios y autorizados por los órganos competentes de las CC.AA. en materia de ordenación del sector pesquero. Por otra parte, en cuanto a los mercados mayoristas conviene señalar que el sector comercializador en España cuenta con un importante instrumento operativo, la Red de MERCAS, por el que se canaliza casi la mitad del pescado consumido. Esta Red constituye un importante elemento para la mejora y racionalización de la distribución de productos pesqueros ya que supone una importante concentración de oferta, es un referente en la formación de precios y posibilita condiciones adecuadas de trazabilidad y seguridad alimentaria. Por último, se encuentran los mercados detallistas, que realizan la venta al por menor directamente al consumidor y donde se encuentran los supermercados e hipermercados (gran distribución) y el detallista especializado que incluye pescaderías, autoservicios, economatos y cocederos de marisco.

Tabla II.7. Canales de comercialización de productos pesqueros en España.

Fuente: MARM (2011b).

La mejora continua de la seguridad alimentaria es primordial para el desarrollo sostenible de la transformación y comercialización de los productos pesqueros y se apoya en el cumplimiento de la normativa por parte del sector. En la UE existe una amplia legislación comunitaria para garantizar que los alimentos sean seguros y salubres, cubriendo todas las etapas de la cadena alimentaria “de la granja a la mesa” (Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria). Con el objeto de facilitar el cumplimiento de esta legislación comunitaria por parte de los operadores económicos se han elaborado guías, como la *Guía para la aplicación de los principales sistemas de certificación de la seguridad alimentaria en el sector de la transformación de los productos de la pesca y la acuicultura* editada por el MARM, la *Guía de prácticas correctas de higiene para producción primaria en pesca*, y la *Guía para la trazabilidad de la producción primaria en pesca extractiva desde la captura hasta su expedición tras su primera venta*, redactadas por el Comité Técnico de Normalización (CTN) de AENOR (UNE 195001:2008 y UNE 195002:2009, respectivamente), encaminadas a garantizar la calidad de los productos y dar respuesta a la demanda de seguridad alimentaria tanto de las autoridades como de los consumidores.

Por otra parte, conviene destacar que la Organización Común de Mercados (OCM) en el sector de los productos de la pesca y la acuicultura se ha constituido como uno de los pilares de la PPC con el objeto de atenuar los efectos de las variaciones de la oferta y la demanda en interés de los pescadores, las empresas de transformación y los consumidores. Las disposiciones relativas a la OCM sobre los productos de la pesca y la acuicultura fueron establecidas en el Reglamento (CEE) N° 2142/1970, del Consejo, de 20 de octubre, relativo a la organización común de mercados en el sector de los productos pesqueros, que ha ido modificándose y evolucionando en respuesta a los cambios producidos en el contexto general e institucional, siendo la última modificación el Reglamento (CE) N° 104/2000, del

Consejo, de 17 de diciembre, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura. En definitiva, se pretende garantizar una gestión sostenible de los recursos marinos mediante la instauración de un mercado común, además de mejorar el abastecimiento de un mercado cada vez más deficitario de materia prima necesaria para la industria de transformación. Actualmente este sector debe hacer frente a una gran variedad de problemas, sobre los que destacan el citado aprovisionamiento de materias primas y las dificultades competitivas ocasionadas por la apertura del mercado mundial. Es por ello que debe seguir adaptándose a las consecuencias de las negociaciones comerciales establecidas entre la UE y otros países o grupos de países, y a las reformas de la OCM.

II.1.4.6. CONSUMO DE PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

En España, aproximadamente un 99% de la producción de productos de la pesca se dedica al consumo humano. En este contexto, España se mantiene como uno de los mayores consumidores de pescado del mundo, alcanzando un consumo *per capita* anual de 36,5 kg, cantidad que duplica la media europea, que se sitúa aproximadamente en 15 kg/persona/año (MARM, 2011a).

Durante el año 2009, el consumo total de productos de la pesca (pescados y mariscos frescos y congelados, y conservas de pescados y moluscos) ascendió a 1.580 millones de kilos y supuso un gasto aproximado de 10.967 millones de euros. El mayor porcentaje del consumo se concentró en los hogares (79,8%), mientras que la restauración comercial supuso el 15,9%, y la restauración social y colectiva el 4,2% restante. En cuanto al gasto, el mayor porcentaje también se registró en los hogares (79,9%). (Martín, 2010). El consumo más notable corresponde al pescado fresco que representa un 44,2% del consumo total de productos de la pesca, seguido del marisco y moluscos frescos (17,5% del consumo total) y de las conservas de pescado y moluscos (14,5% del consumo total). Por su parte, los mariscos, moluscos y crustáceos congelados y cocidos representan consumos menores (12,5%) mientras que los pescados congelados son los que menos se consumen (11,2% del consumo total) (Martín, 2010).

La frecuencia de consumo en los hogares españoles es bastante alta, aunque la frecuencia de compra varía en función del tipo de producto que se va a adquirir. Como parece lógico, el pescado fresco se demanda con mayor frecuencia (más de siete veces al mes) mientras que el pescado preparado cuenta con la menor frecuencia de demanda en los hogares españoles (una vez cada dos meses). El pescado congelado se compra tres veces al mes, el embarquetado tan sólo una y las conservas y ahumado son adquiridos, de media, dos veces al mes (Martín, 2008). Conviene destacar que la demanda interna de pescado es tan importante que resulta necesario importar grandes cantidades de pescado para poder atender el abastecimiento de nuestros mercados. España tiene una fuerte dependencia externa ya que, la producción pesquera y acuícola, a pesar de su importancia, no es suficiente para cubrir las necesidades del mercado.

II.1.5. CALIDAD DEL PESCADO FRESCO

El término calidad tiene un significado muy amplio y abarca aspectos como seguridad, composición, valor nutritivo, grado de alteración producido durante la elaboración, disponibilidad, presentación, distribución, etiquetado y precio (Fig. 2.6) (Connell, 1988; Huss, 1997). Hay que tener en cuenta que, aunque en último término la calidad constituye un atributo subjetivo dependiente del consumidor, dentro del ámbito de la industria, la calidad se debe asociar y definir para cada tipo de producto (Connell, 1988; Huss, 1999).

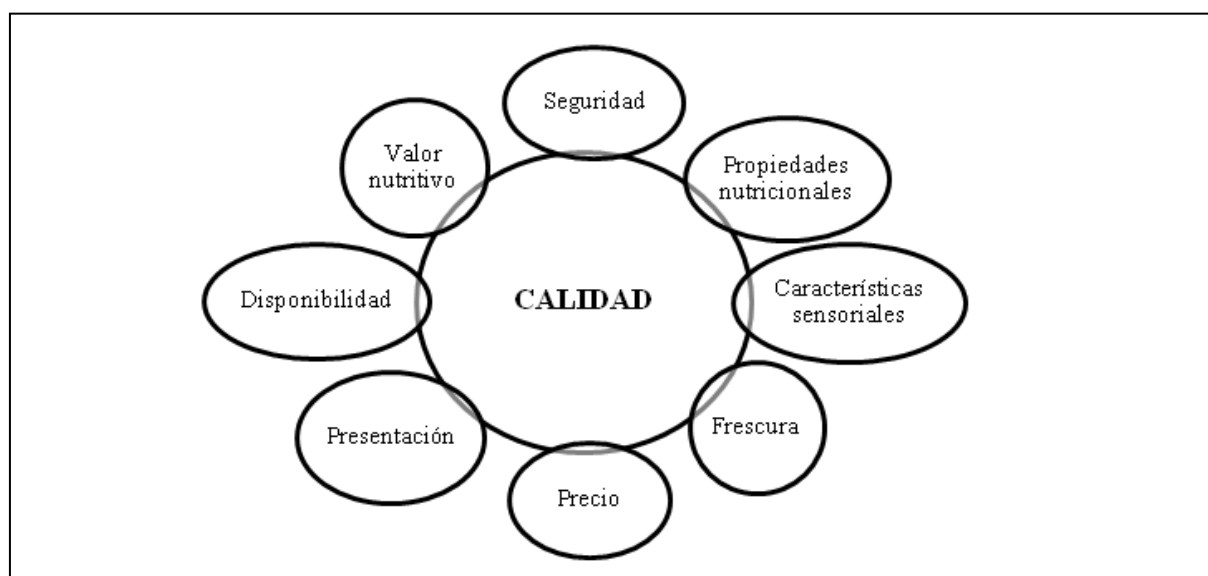


Figura 2.6. Factores que contribuyen a la calidad del pescado. Adaptado de Ólafsdóttir et al. (1997).

En la industria pesquera, el término de calidad a menudo se relaciona con el precio de la especie o con el tamaño de la pieza. Así, por ejemplo, un pescado puede ser considerado de calidad inferior por un procesador debido a que ejemplares demasiado pequeños dan lugar a bajos rendimientos y consecuentemente a poco beneficio; sin embargo, para las autoridades sanitarias, que están principalmente interesadas en posibles riesgos para la salud, la buena calidad está más relacionada con la inocuidad y la seguridad de los alimentos entendida como la ausencia de peligros tales como bacterias y parásitos patógenos y compuestos químicos (Huss, 1997).

El atributo más importante de la calidad del pescado es la frescura, que hace referencia al grado de deterioro que ha sufrido el producto y que se determina tanto a través de la evaluación sensorial como de métodos analíticos. Como consecuencia de su composición química y del pH poco ácido de su carne, el pescado constituye un alimento altamente perecedero, que puede deteriorarse por la acción de enzimas autolíticas endógenas y/o por el desarrollo de la microbiota presente en el mismo. La microbiota del pescado se encuentra principalmente sobre la piel y en el intestino, y una vez que el pez muere, se extiende y se multiplica a otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas como sustratos de bajo peso molecular, obtenidos de los procesos de autólisis, lo que unido a un pH relativamente elevado,

favorece su desarrollo. Debido a este crecimiento, aparecen compuestos volátiles que son los responsables de olores y sabores desagradables, que finalmente conducen al rechazo sensorial del pescado. Por otra parte, la acción de las proteasas del propio pescado y las bacterias provocan cambios en las propiedades de textura que también afectan a la calidad de estos productos (Pascual-Anderson y Calderón, 2000).

La velocidad de los procesos de descomposición que ocurren en el pescado depende de factores intrínsecos de la especie tales como la edad, el tamaño, la composición química de los tejidos, el estado nutricional y las condiciones fisiológicas de los ejemplares. Asimismo, depende de la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota inicial del pescado, que está asociada al ambiente de procedencia. Por último, factores extrínsecos como las condiciones de captura y los métodos de conservación (temperatura y tiempo) también contribuyen de forma significativa a la velocidad de los procesos de deterioro que se originan en el pescado (Connell, 1988).

En definitiva, existen diversos factores que influyen en la calidad del producto final, siendo necesaria una buena coordinación de todos los aspectos y partes implicadas en la producción de productos pesqueros para llevar al mercado un producto de la mayor frescura y calidad posibles.

II.1.5.1. ANATOMÍA DEL MÚSCULO DEL PESCADO

La principal parte comestible del pescado está constituida por los músculos corporales de mayor tamaño, y, aunque en menor cantidad, la piel y los órganos, como el hígado y las gónadas, también son aptos para el consumo humano. La anatomía del músculo del pez difiere de la de los animales terrestres, puesto que carece del sistema conectivo (tendones) que conecta los paquetes musculares al esqueleto del animal. Por el contrario, los peces tienen células musculares que corren en paralelo ancladas al esqueleto y la piel, y que están separadas perpendicularmente por tabiques de tejido conectivo, (Love, 1982; Gil, 2010). El tejido muscular del pez, como el de los mamíferos, está compuesto por músculo estriado. Generalmente el tejido muscular del pez es blanco, pero dependiendo de la especie, muchos presentan cierta cantidad de tejido oscuro de color marrón rojizo. El músculo oscuro se localiza exactamente debajo de la piel a lo largo del cuerpo del pez. La proporción entre músculo oscuro y blanco varía con la actividad del pez; así pues, en los pelágicos, que nadan más o menos de forma continua, como por ejemplo el arenque, existe gran cantidad de músculo oscuro; sin embargo, en los demersales, que al vivir en el fondo del mar se mueven sólo periódicamente, como por ejemplo la merluza, la cantidad de músculo oscuro es pequeña. La diferencia en la composición química de ambos tipos de músculos radica en el contenido de lípidos y mioglobina, que es más cuantioso en el músculo oscuro. El músculo oscuro está diseñado para movimientos continuos y prolongados, mientras que el claro se adapta a movimientos súbitos, fuertes y cortos. Además la fuente principal de energía para generar adenosín trifosfato (ATP, del inglés *Adenosine Triphosphate*) en el músculo blanco es el glucógeno, mientras que en el músculo oscuro la energía puede ser obtenida también a partir de los lípidos (Love, 1982; Gil, 2010).

II.1.5.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PESCADO

La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, siendo los principales componentes químicos de la carne del pescado el agua, las proteínas y los lípidos. Estos componentes tienen una gran importancia en lo referente a su valor nutritivo, textura, características sensoriales y capacidad de almacenamiento. Los restantes componentes son los hidratos de carbono, las vitaminas y los minerales, que, a pesar de hallarse en menor cantidad, desempeñan un papel esencial en el valor nutricional del pescado (Gil, 2010). Existe una variación substancial en los principales constituyentes del músculo del pescado (Tabla II.8), que depende de diversos factores tales como la alimentación, la estación del año, el comportamiento migratorio y los cambios sexuales relacionados con el desove (Huss, 1999).

Hay que tener en cuenta que los factores que provocan estas variaciones en la composición química de las diferentes especies de pescados son observados en peces silvestres, tanto de aguas marinas como de aguas continentales. Sin embargo, en los peces criados en acuicultura, a pesar de poder existir ligeras variaciones en su composición química, la dieta y otros factores están sometidos a un estricto control, por lo que se puede predecir más fácilmente su composición. En este sentido, el acuicultor tiene la posibilidad, hasta cierto punto, de diseñar la composición del pez mediante la selección de las condiciones de cultivo, ya que puede controlar factores fisiológicos como la edad y el ritmo de crecimiento, factores ambientales como la temperatura del agua y la presión, factores dietéticos como la composición del alimento, periodos de inanición y sobrealimentación y la presencia o ausencia de determinados componentes, que tienen un impacto en la composición y la calidad del pescado de acuicultura (Reinitz *et al.*, 1979; Reinitz, 1983; Haard, 1993; Huss, 1999).

Tabla II.8. Principales componentes (%) del músculo de pescado y de vacuno.

Constituyente	Pescado (filete)			Carne de vacuno (músculo aislado)
	Mínimo ^a	Variación normal	Máximo ^a	
Agua	28	60-80	96	75
Lípidos	0,1	0,2-25	67	3
Proteínas	6	16-21	28	20
Hidratos de carbono	-	< 0,5	-	1

^aLos valores máximos y mínimos son casos extremos y raramente se encuentran. *Adaptado de Huss (1998).*

II.1.5.2.1. AGUA

El músculo de los peces invertebrados marinos puede contener desde un 28% hasta un 96% de agua, dependiendo de la especie y del estado nutritivo (Tabla II.8). El pez tiene periodos de inanición por razones naturales o fisiológicas (como desove o migración) o por factores externos como la escasez de

alimento, lo que produce el consumo de las reservas energéticas de los tejidos y, como consecuencia, el incremento de la cantidad de agua presente en la carne. En condiciones normales puede considerarse que el contenido acuoso oscila entre el 60 y el 80%, estando muy directamente relacionado con el contenido lipídico (Love, 1982; Huss 1999; Gil, 2010).

II.1.5.2.2. LÍPIDOS

Los lípidos se incluyen entre los componentes principales de los organismos marinos, constituyendo el elemento que muestra la mayor variación dentro de los mismos (Tabla II.8). Como se ha mencionado anteriormente, el contenido lipídico del pescado está inversamente relacionado con el acuoso, ya que los lípidos actúan como reserva energética que se utiliza durante los distintos estados fisiológicos. Estos componentes se localizan mayoritariamente en el tejido subcutáneo de los peces grasos, en el hígado de los peces magros, y en el tejido muscular y en las gónadas maduras de ambos tipos de peces (Love, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010).

Según el contenido en grasa de la porción comestible del pescado, éstos se pueden clasificar como: (i) pescados magros (o pescado blanco), con un contenido en grasa de hasta el 2,5%, como el bacalao y la merluza; (ii) pescados semigrasos o semimagros, con un contenido del 2,5 al 6%, como la dorada y la lubina, y (iii) pescados grasos (o pescado azul), con un contenido del 6 al 25%, como la caballa y el salmón (Tabla II.9) (Gil, 2010). El contenido de lípidos en filetes de pescado magro es bajo y estable, mientras que el de filetes de especies grasas varía considerablemente, lo que se refleja en el porcentaje de agua, dado que la grasa y el agua normalmente constituyen el 80% del filete. Esta proporcionalidad se puede emplear para hacer una estimación del contenido de grasa, a partir de la determinación del contenido de agua en el filete. De hecho, este principio ha sido utilizado con mucho éxito en un instrumento analizador de grasas denominado Medidor Torry de Grasas en Pescado, el cual en realidad mide el contenido de agua (Kent *et al.*, 1992).

Tabla II.9. Clasificación de especies de pescado según su contenido graso.

Pescado magro o blanco ($\leq 2,5\%$) ^a	Pescado semigraso (2,5-6%)	Pescado graso o azul (6-25%)
Acedía (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)
Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassous</i>)	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Atún (<i>Tunnus</i> spp.)
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Pez espada (<i>Xiphias gladius</i>)	Bonito del norte (<i>Thunnus alalunga</i>)
Gallo (<i>Lepidorhombus</i> spp.)	Salmonete (<i>Mullus</i> spp.)	Boquerón (<i>Engraulis encrasicolus</i>)
Lenguado (<i>Solea solea</i>)	Trucha (<i>Salmo trutta</i>)	Caballa (<i>Scomber scombrus</i>)
Merluza (<i>Merluccius merluccius</i>)		Estornino (<i>Scomber japonicus</i>)
Rape (<i>Lophius</i> spp.)		Jurel (<i>Trachurus</i> spp.)
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)		Japuta (<i>Brama brama</i>)
Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)		Salmón (<i>Salmo salar</i>)
		Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)

^aContenido en grasa de la porción comestible del pescado. Fuente: Gil (2010).

La composición de los lípidos marinos en ácidos grasos es mucho más compleja que la de los lípidos de animales y plantas terrestres. Los lípidos del pescado se caracterizan por presentar triglicéridos con una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (14–22 átomos de carbono), especialmente de la serie omega 3 (dobles enlaces situados en el tercer átomo de carbono, a partir del grupo metilo). Concretamente, los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) y docosahexaenoico (DHA 22:6 ω 3) son característicos y específicos del pescado, están presentes en el plancton marino y en algunas algas, y se incorporan a los tejidos de los peces al ser ingeridos por ellos (Huss, 1999; Gil, 2010). Conviene destacar que tanto el EPA como el DHA juegan un papel muy importante en la dieta humana puesto que han sido demostrados sus efectos beneficiosos para la salud mediante la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, por lo que la Organización Mundial de la Salud recomienda su consumo (OMS, 2003).

Las variaciones tanto cualitativas como cuantitativas de la composición lipídica dependen de factores como la especie, la edad, el sexo y la época estacional. A menudo, dentro de ciertas especies, la variación presenta una curva estacional característica con un mínimo cuando se acerca la época de desove, como es el caso del arenque y la caballa (Huss, 1999). El contenido de grasa en el pescado, independientemente de que sea magro o graso, tiene consecuencias sobre sus características tecnológicas *post mortem*. En este sentido, los cambios que ocurren en el pescado magro fresco pueden ser anticipados mediante el conocimiento de las reacciones bioquímicas en la fracción proteica, mientras que en las especies grasas deben incluirse también los cambios en la fracción lipídica, entre los que destaca la oxidación lipídica.

II.1.5.2.3. COMPUESTOS NITROGENADOS

Los compuestos nitrogenados pueden ser proteicos o no proteicos. En el pescado, el contenido de ambas fracciones depende de la especie, siendo más constante el contenido en proteínas (aprox., 12–20%) (Gil, 2010).

II.1.5.2.3.1. Proteínas

Las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en: (i) proteínas miofibrilares del sistema contráctil (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 70–80% del contenido total de proteínas; (ii) proteínas sarcoplasmáticas (mioalbúmina, globulina y enzimas), que constituyen el 25–30% de las proteínas, y (iii) proteínas del tejido conectivo (colágeno) que constituye 3–10% de las proteínas (Love, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010). Las proteínas del pescado contienen todos los aminoácidos esenciales y, al igual que las proteínas de la leche, del huevo y de la carne de mamíferos, tiene un valor biológico muy alto (Gil, 2010).

II.1.5.2.3.2. Nitrógeno no proteico (NNP)

La fracción de NNP en el pescado está compuesta principalmente por (Love, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010):

1. Aminas y óxidos de aminas. El óxido de trimetilamina (OTMA) es uno de los componentes nitrogenados no proteicos más abundante en el pescado. Este compuesto se encuentra en todos los peces de agua de mar en cantidades del 1 al 7% del tejido muscular (peso seco); sin embargo, las especies de agua dulce contienen sólo cifras mínimas o nulas de OTMA, estando éste ausente en organismos terrestres. Se han propuesto diferentes hipótesis respecto a la función del OTMA, pero la más ampliamente aceptada es la que atribuye a dicho compuesto un papel sustancial en los procesos de osmorregulación (Huss, 1999). Durante el almacenamiento en refrigeración, la degradación bacteriana del OTMA produce trimetilamina (TMA), que es uno de los compuestos responsables del olor característico del pescado deteriorado.
2. Aminoácidos libres. La histidina es uno de los aminoácidos libres más importantes, puesto que durante la degradación bacteriana se transforma en histamina, amina biógena que, a bajas concentraciones puede provocar síntomas de intoxicación en personas sensibles a la misma, proceso que a menudo se confunde con una reacción alérgica al pescado. La concentración de este aminoácido es menor cuanto más clara es la carne del pescado; así, especies activas, veloces, con músculo oscuro, como el atún y la caballa, tienen un alto contenido en histidina. También existen otros aminoácidos libres y péptidos como la anserina, carnosina, taurina y glicina.
3. Creatinina. La creatinina es cuantitativamente el principal componente de la fracción de NNP, excepto en los peces cartilagosos. Cuando el pez está quieto, la mayor parte de la creatinina es fosforilada y proporciona energía para la contracción muscular.
4. Urea. En los peces cartilagosos la urea es el componente mayoritario de la fracción de NNP, convirtiéndose en amoníaco durante su almacenamiento.

II.1.5.2.4. HIDRATOS DE CARBONO

El contenido de hidratos de carbono en el músculo de pescado es muy bajo, generalmente inferior al 0,5%. Esto es típico del músculo estriado, en el cual los carbohidratos se encuentran en forma de glucógeno y como parte de los constituyentes químicos de los nucleótidos. Estos últimos son la fuente de la ribosa liberada durante los procesos autolíticos *post mortem* (sección II.1.5.3) (Love, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010).

II.1.5.2.5. VITAMINAS Y MINERALES

La cantidad de vitaminas y minerales es específica de cada especie de pescado y además, puede variar con la estación del año. En lo que respecta a los minerales, la carne de pescado se considera una fuente valiosa de calcio y fósforo en particular, así como de hierro, zinc y cobre. Los peces de mar tienen, además, un alto contenido de iodo y debe tenerse en cuenta que el contenido de sodio en la carne de pescado es relativamente bajo, lo que lo hace apropiado para regímenes alimentarios de tal naturaleza. Además, el pescado es también una buena fuente de potasio. En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y, en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D. El contenido de vitaminas es comparable con el de la carne de los mamíferos excepto en los casos de las

vitaminas liposolubles, que se encuentran en grandes cantidades en la carne de las especies grasas, y en abundancia en el hígado de especies magras como el bacalao; no obstante, la variabilidad depende del estado fisiológico del pescado (Love, 1982; Huss, 1999; Pascual-Anderson y Calderón, 2000; Gil, 2010).

II.1.5.3. CAMBIOS *post mortem* EN EL PESCADO

Inmediatamente después de la muerte del pez, comienzan a producirse una serie de cambios químicos y biológicos llevados a cabo por las enzimas propias del pescado (cambios autolíticos) y por bacterias (cambios microbiológicos), que resultan en la descomposición y el deterioro del pescado (Huss, 1999). La mayor parte de las operaciones de procesamiento posteriores a la captura del pescado tienen como objetivo ralentizar estos procesos para que el pescado llegue al consumidor lo menos deteriorado posible.

II.1.5.3.1. CAMBIOS AUTOLÍTICOS

Tras la captura y muerte del pez, el corazón deja de latir y se interrumpe la circulación sanguínea, lo que priva al músculo del aporte de oxígeno y de toda una serie de nutrientes celulares. A partir de ese momento la célula comienza una serie de procesos caracterizados por la descomposición de glucógeno (glucogenólisis) y la degradación de compuestos ricos en energía (Tabla II.10) (Hobbs, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010).

II.1.5.3.1.1. Cambios autolíticos en los hidratos de carbono

Los primeros procesos autolíticos en el tejido muscular del pescado involucran a los hidratos de carbono y los nucleótidos. Así pues, durante un corto periodo de tiempo, las células musculares continúan los procesos fisiológicos normales; sin embargo, cuando la concentración de ATP desciende por debajo de un determinado valor crítico ($\leq 1,0 \mu\text{moles/g}$ de músculo), se instaura el proceso de *rigor mortis* (sección II.1.5.3.3). Con la finalidad de obtener energía, y dado que no hay provisión de oxígeno, la glucogenólisis en el tejido muscular *post mortem* tiene lugar en condiciones anaeróbicas, y como consecuencia el producto final es principalmente ácido láctico, lo que resulta en la concomitante disminución del pH en el músculo. Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de glucógeno en el músculo del pescado, menor será el pH final. En general, el músculo de pescado contiene cantidades relativamente bajas de glucógeno comparado con el músculo de mamíferos, y por lo tanto el pH final *post mortem* es mayor, lo que hace que la carne de pescado sea más susceptible al ataque microbiano. Aunque hay grandes variaciones en el contenido de glucógeno entre las distintas especies, y también dentro de la misma especie, como regla general, los peces que no han sido sometidos a situaciones de estrés y están bien alimentados, contienen más glucógeno que los exhaustos y hambrientos, ya que el pescado sometido a esfuerzo utiliza el glucógeno rápidamente (Huss, 1999; Gil, 2010). La disminución del pH *post mortem* en el músculo del pescado tiene asimismo un efecto en las propiedades físicas del músculo. En este sentido, a medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de retener agua. La pérdida de agua tiene un efecto perjudicial en la textura del músculo, por lo que el pescado en

rigor mortis es particularmente inadecuado para el procesado. La relajación del tejido muscular tras el *rigor mortis* (sección II.1.5.3.3) está probablemente relacionado con la activación de una o más enzimas musculares presentes en el pescado (principalmente catepsinas), las cuales digieren ciertos componentes que intervienen en el proceso de *rigor mortis*. Como resultado de la acción de estas enzimas se forman péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que constituyen sustratos para el crecimiento microbiano (Huss, 1999; Gil, 2010).

II.1.5.3.1.2. Cambios autolíticos en los nucleótidos

Los procesos autolíticos en los nucleótidos afectan al ATP que, mediante reacciones de defosforilación y desaminación, da lugar a adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (HxR) e hipoxantina (Hx) y, finalmente, a ribosa. Antes del comienzo del *rigor mortis*, el glucógeno y el ATP casi han desaparecido y, simultáneamente se va acumulando IMP y, posteriormente, HxR. Cuando los niveles de IMP y HxR comienzan a disminuir, el contenido de Hx aumenta. Estos procesos autolíticos se producen de la misma forma en todos los pescados, pero su velocidad varía enormemente entre diferentes especies (Huss, 1999; Gil, 2010). La importancia organoléptica de estos productos de degradación autolítica se describe en la sección II.1.5.3.3.

II.1.5.3.1.3. Cambios autolíticos en las proteínas

Los cambios autolíticos en las proteínas son mucho menos pronunciados que los descritos para los nucleótidos. A este respecto, se han aislado diferentes tipos de proteasas del tejido muscular del pescado cuyo efecto está generalmente relacionado con un extenso ablandamiento del tejido. Las enzimas más importantes del músculo son las catepsinas, localizadas en su mayor parte en los lisosomas y con actividad hidrolítica. Las catepsinas D y L desempeñan un papel primordial en la degradación autolítica del tejido muscular del pescado dado que presentan actividad en un intervalo amplio de pH (pH 2–7); sin embargo, las restantes catepsinas (A, B y C) presentan actividad en un rango relativamente reducido de pH, demasiado bajo para tener un significado fisiológico. Las catepsinas permanecen generalmente inactivas dentro del tejido vivo, pero son liberadas como consecuencia de la incorrecta manipulación del pescado o su congelación y descongelación (Huss, 1999; Ladrat *et al.*, 2003; Gil, 2010).

Otro tipo de proteasas aisladas de la carne del pescado asociadas con los procesos autolíticos *post mortem* producidos en el músculo del pescado son las calpaínas, un grupo de endopeptidasas intracelulares dependientes de cisteína y de calcio. Estas proteasas son activas a pH fisiológico y a bajas temperaturas, lo cual hace razonable sospechar de su importancia en el ablandamiento del pescado durante el almacenamiento en refrigeración (Huss, 1999; Gil, 2010). Por último, las colagenasas constituyen otro grupo de enzimas importantes en lo que se refiere a los cambios texturales que ocurren en el pescado, ya que durante el almacenamiento prolongado en refrigeración se degradan las fibras de colágeno del músculo de pescado causando su desgajamiento (Huss, 1999).

II.1.5.3.1.4. Cambios autolíticos producidos por enzimas digestivas

Las enzimas del aparato gastrointestinal desempeñan un papel importante en la autólisis del pescado no eviscerado. Durante periodos de alimentación abundante, el vientre de ciertos pescados (*e.g.*, caballa y arenque) es muy susceptible a la degradación y puede explotar a las pocas horas de su captura. Todavía no se dispone de una explicación de este fenómeno, pero se sabe que el tejido conectivo es más débil si el pH es bajo, y el pH *post mortem* disminuye cuando el pescado es capturado durante periodos de alimentación intensa. Por lo tanto, se considera que la producción y actividad de las enzimas digestivas son más fuertes durante estos periodos (Hobbs, 1982; Huss, 1999; Gil, 2010). Las proteasas digestivas más importantes son semejantes a la tripsina, localizadas en el ciego, así como otras enzimas semejantes a la pepsina localizadas en la pared del estómago. Estas enzimas, activas a pH ácido, rompen las proteínas en péptidos de gran tamaño que posteriormente son degradados por diferentes exopeptidasas (Huss, 1999; Gil, 2010).

II.1.5.3.1.5. Cambios autolíticos durante el almacenamiento en congelación

En algunas especies acuícolas existe una enzima denominada OTMA dimetilasa, presente en el músculo, capaz de descomponer el OTMA en dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA). Este proceso tiene una importancia limitada en el pescado refrigerado, ya que las bacterias descomponen el OTMA a TMA de forma mucho más rápida; sin embargo, cuando el pescado se congela y el crecimiento microbiano está inhibido, la formación de DMA y FA es mucho mayor y puede constituir un serio problema durante su almacenamiento. El FA induce el entrecruzamiento de las proteínas musculares ocasionando endurecimiento del músculo y la pérdida de su capacidad de retención de agua. Por lo general estas enzimas son más activas tras roturas tisulares producidas durante la congelación, por lo que es conveniente reducir las fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento en congelado y evitar también la manipulación tosca o la aplicación de presión física sobre el pescado antes de congelar (Huss, 1999; Gil, 2010).

II.1.5.3.1.6. Hidrólisis y oxidación de los lípidos

Las modificaciones más importantes que tienen lugar en la fracción lipídica durante el almacenamiento *post mortem* de las especies pesqueras están relacionadas con procesos de hidrólisis donde intervienen enzimas tisulares, digestivas y microbianas, y con reacciones de oxidación de naturaleza química. Ambas reacciones son de gran importancia para la vida útil de estos productos ya que resultan en la producción de distintas sustancias, que pueden conferir sabores y olores desagradables (rancio) y contribuir a cambios en la textura (Huss, 1999).

Los pescados grasos son particularmente susceptibles a la degradación lipídica, que afecta a la calidad por la aparición de sabores y olores a rancio, así como de decoloración, incluso a temperaturas bajo cero. Por lo tanto, el significado relativo de estas reacciones depende principalmente de la especie de pescado y de la temperatura de almacenamiento (Huss, 1999).

Tabla II.10. Resumen de los cambios autolíticos producidos en el pescado.

Sustrato	Enzimas	Cambios	Prevención/inhibición
Glucógeno	Enzimas glucolíticas	Producción de ácido láctico y disminución del pH de los tejidos	Evitar el agotamiento pre-rigor mortis
ATP, ADP, AMP e IMP	Enzimas autolíticas involucradas en la degradación de nucleótidos	Pérdida del sabor a pescado fresco y producción gradual del sabor amargo	Evitar el agotamiento pre-rigor mortis Manipular adecuadamente
Proteínas y péptidos	Catepsinas	Ablandamiento del tejido	Manipular adecuadamente
	Quimotripsina, tripsina, carboxipeptidasas	Autólisis de la cavidad visceral en especies no evisceradas	Evitar procesos de congelación/descongelación Manipular adecuadamente
Proteínas miofibrilares	Calpaína	Ablandamiento del tejido	-
Tejido conectivo	Colagenasas	Ablandamiento del tejido	Controlar tiempo/temperatura de almacenamiento
OTMA	OTMA dimetilasa	Endurecimiento inducido por FA	Evitar procesos de congelación/descongelación Manipular adecuadamente

Adaptada de Huss (1999).

II.1.5.3.2. CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS

II.1.5.3.2.1. Microbiota inicial de los peces

Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas del pez (piel y agallas) y en el intestino del pescado vivo o recién capturado, siendo su número y composición muy variables, dependiendo más de las características de su hábitat (temperatura y salinidad del agua, nivel de oxígeno disuelto, grado de contaminación, etc.) que de la propia especie acuícola (Shewan, 1977; Huss, 1999; Apun *et al.*, 1999; Austin, 2002). De forma general, la microbiota predominante del pescado de aguas templadas recién capturado la forman principalmente bacilos aerobios y anaerobios facultativos, psicrótrofos y Gram-negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Photobacterium*. Asimismo, se han encontrado en distintas proporciones microorganismos Gram-positivos como *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Corynebacterium* spp. (Shewan, 1977; Huss, 1999; Gram and Huss, 1996; González *et al.*, 1999; Wilson, 2008; Leroi, 2010). La microbiota de los peces de aguas tropicales es muy similar a la de los de aguas templadas (Acuff *et al.*, 1984; Huss, 1999; Surendran *et al.*, 1989; Gram y Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998a; Austin, 2002), aunque con una carga ligeramente superior de bacterias Gram-positivas y de origen entérico (Liston, 1980). La microbiota de los peces de agua dulce presenta diferencias con respecto a la de los de agua marina (Huss, 1999). A este respecto, las especies pertenecientes al género *Aeromonas* son típicas de los peces de agua dulce, mientras que las bacterias de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*, que requieren sodio para su crecimiento, son típicas de aguas marinas. No obstante, también se han aislado cepas de *Sh. putrefaciens* de agua dulce (DiChristina y DeLong, 1993; Spanggaard *et al.*, 1993).

La microbiota del tracto gastrointestinal de los peces ha sido más investigada que la de la piel o las mucosas debido a su importancia en la nutrición y la salud de los peces de acuicultura (Ringø *et al.*, 1995, 2000, 2001; González *et al.*, 1999; Spanggaard *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2004; Burr *et al.*, 2005;

Bucio *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007a, 2007b; Denev *et al.*, 2009). A pesar de que este entorno es parcialmente anaeróbico, la mayoría de los estudios revelan un predominio de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, que también se han aislado del agua circundante. Este hecho puede ser debido a que la metodología empleada en la recuperación de los microorganismos y en su cultivo no siempre es adecuada para anaerobios estrictos, lo que pone de manifiesto que la microbiota anaerobia está escasamente caracterizada y subestimada (Burr *et al.*, 2005). De forma general, la microbiota gastrointestinal de especies marinas está compuesta por bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas de géneros como, entre otros, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Cahill *et al.*, 1990; Onarheim *et al.*, 1994; Blanch *et al.*, 1997; Ringø *et al.*, 2006; Brunvold *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Por otra parte, la microbiota de especies de agua dulce se compone de miembros pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Fusobacterium* (Ringø *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 2004; Kapetanovic *et al.*, 2005; Hovda *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Asimismo, se han encontrado especies de bacterias lácticas de géneros como, entre otros, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y especialmente *Carnobacterium*, que forman parte de la microbiota intestinal habitual de algunos pescados estudiados, tanto de agua dulce como salada (Ringø y Gatesoupe 1998; Cai *et al.*, 1999; Ringø *et al.*, 2000, 2001; González *et al.*, 2000; Asfie *et al.*, 2003; Hagi *et al.*, 2004; Bucio *et al.*, 2006; Hovda *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007a, 2008; Vijayabaskar y Somasundaram, 2008).

Conviene considerar que la gran cantidad de especies de peces que existen, los diferentes ambientes en los que son capturados y las distintas metodologías empleadas para el recuento e identificación de microorganismos son factores que contribuyen a que existan diferencias tanto en la composición como en la concentración de la microbiota inicial del pescado según los distintos autores (Fraser y Sumar, 1998b; Huss, 1998; Leroi, 2010). A este respecto, diversos estudios realizados en ambientes acuáticos sugieren la necesidad de emplear técnicas moleculares que permitan detectar bacterias viables no cultivables, puesto que los métodos cultivo-dependientes empleados tradicionalmente, limitados a la detección e identificación de los microorganismos cultivables, pueden llevar a conclusiones erróneas en cuanto a la composición real de la microbiota evaluada (Huber *et al.*, 2004; Burr *et al.*, 2005; Leroi, 2010).

II.1.5.3.2.2. Cambios en la microbiota durante el almacenamiento y el deterioro

El músculo de un pez saludable recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico previene el crecimiento de bacterias en el mismo; sin embargo, cuando el pez muere, el sistema inmunológico cesa de funcionar, por lo que las bacterias comienzan a proliferar libremente. En la superficie de la piel, las bacterias colonizan inicialmente la base de las escamas y, durante el almacenamiento, invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares. Los sustratos disponibles para las bacterias están representados por los hidratos de carbono (*e.g.*, lactato y ribosa), los fragmentos de nucleótidos y la fracción de NNP (Fraser y Sumar, 1998b; Huss, 1999).

En el pescado, el crecimiento microbiano depende de factores tales como la especie, la edad, el tamaño del ejemplar, la alimentación, el estado fisiológico y la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota inicial. Asimismo, también depende del arte de pesca y de la manipulación y la temperatura de almacenamiento a las que haya sido sometido. El método de captura es con frecuencia el factor que más influye en el número y tipo de bacterias presentes en el pescado; así por ejemplo, aquellos ejemplares obtenidos por arrastre presentan usualmente una carga bacteriana mayor que los capturados con línea (Ward y Baj, 1988; Gennari *et al.*, 1999; Huss, 1999). En pescados capturados en aguas templadas, las bacterias entran en fase exponencial de crecimiento casi inmediatamente después de la muerte del pez, lo que ocurre incluso cuando el pescado es almacenado en hielo, probablemente porque la microbiota se encuentra adaptada a las temperaturas de enfriamiento. Durante el almacenamiento en hielo, la población bacteriana se duplica en aproximadamente un día y, después de dos o tres semanas, alcanza unas 10^8 – 10^9 ufc/g de músculo o ufc/cm de piel. (Huss, 1999). Por otra parte,, en pescados provenientes de aguas tropicales, las bacterias generalmente atraviesan por una fase de latencia de una a dos semanas cuando el pescado se almacena en hielo, iniciándose posteriormente el crecimiento exponencial. No obstante, durante el deterioro, el nivel de bacterias en pescados de aguas tropicales es similar al nivel encontrado en especies de aguas templadas (Gram *et al.*, 1990).

Es necesario tener en consideración que la mayoría de los microorganismos presentes en el pescado no juegan ningún papel en el deterioro del mismo, ya que sólo una pequeña fracción de la microbiota presente en el mismo, denominada microorganismos específicos del deterioro (MED) (del inglés, *Specific Spoilage Organisms* o SSOs), es la causante de los olores y sabores desagradables (Tabla II.11) (Fraser y Sumar, 1998b; Huss, 1999; Gram y Dalgaard, 2002). La mayoría de los MED presentan la capacidad de producir H_2S y reducir el OTMA, cabiendo destacar entre ellos a *Sh. putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* y *Pseudomonas* spp. (Connell, 1988; Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Se pueden encontrar distintos MED en diferentes productos pesqueros, aunquey en ocasiones pueden estar constituidos por una única especie (Huss, 1999; Gram y Dalgaard, 2002). Así, por ejemplo, *Sh. putrefaciens* y *Pseudomonas* spp. han sido identificadas como los MED del pescado de agua salada y agua dulce, respectivamente, almacenados aeróbicamente en hielo, y en el pescado refrigerado y almacenado en condiciones de anaerobiosis o en atmósferas modificadas con CO_2 , *Ph. phosphoreum* es el microorganismo responsable de su deterioro (Gram *et al.*, 1987; Dalgaard *et al.*, 1993; Gram y Dalgaard, 2002). En este contexto, existe una buena correlación entre los MED y la frescura del pescado, de forma que el recuento de los mismos constituye una medida más precisa que los recuentos totales de microorganismos para la determinación de la frescura del pescado (Huss, 1999; Ólafsdóttir *et al.*, 1997; Gram y Dalgaard, 2002).

Tabla II.11. Sustratos nitrogenados del pescado, MED^a y principales compuestos de la degradación bacteriana que determinan su calidad.

Sustrato	MED ^a	Compuestos producidos por la acción bacteriana
Óxido de trimetilamina (OTMA)	<i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Aeromonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.	Trimetilamina (TMA)
Cisteína	<i>Sh. putrefaciens</i> , <i>Vibrio</i> spp.	Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)
Metionina	<i>Sh. putrefaciens</i>	Metil mercaptano [(CH ₃)SH], dimetilsulfuro [(CH ₃) ₂ S]
Hidratos de carbono y lactato	<i>Proteus</i> spp.	Acetato, CO ₂ , H ₂ O
Inosina (HxR), inosina monofosfato (IMP)	<i>Sh. putrefaciens</i> , <i>Ph. phosphoreum</i>	Hipoxantina (Hx)
Aminoácidos (glicina, serina, leucina)	<i>Pseudomonas</i> spp.	Ésteres, cetonas, aldehídos
Urea, aminoácidos	Anaerobios estrictos (<i>Fusobacterium</i>)	Amoníaco (NH ₃), ácidos acético, butírico y propiónico

^aMED, microorganismos específicos del deterioro que producen los compuestos indicados. *Adaptada de Huss (1999).*

II.1.5.3.3. CAMBIOS SENSORIALES

Los cambios sensoriales son los que percibimos a través de los sentidos, como la apariencia, el olor, la textura y el sabor. A este respecto, los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con su apariencia y textura, y, además, conviene destacar que el sabor característico de las especies normalmente se desarrolla durante los dos primeros días de almacenamiento en hielo (Huss, 1999). El cambio más dramático del pescado es el desarrollo del *rigor mortis*, proceso que se instaura cuando el nivel intracelular de ATP llega a valores muy bajos, y que es el resultado de una compleja combinación de procesos bioquímicos en el músculo que provoca el entrecruzamiento irreversible de los filamentos de actina y miosina (Watabe *et al.*, 1989, 1991; Huss, 1999). Inmediatamente después de la muerte del pez, se observa una etapa de pre-*rigor* que persiste durante algunas horas, en la que el músculo está totalmente relajado y presenta una textura flexible y elástica. A continuación comienza el estado de *rigor mortis* en el que el músculo se contrae, se torna duro y rígido y todo el cuerpo se vuelve inflexible, condición que generalmente se mantiene durante uno o más días. Posteriormente se resuelve el *rigor mortis*, debido fundamentalmente a la acción de enzimas proteolíticas endógenas que provocan la rotura de las proteínas miofibrilares (Kubota *et al.*, 2001; Ladrat *et al.*, 2003), lo que hace que el músculo se relaje de nuevo y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor mortis*. A partir de ese momento se produce una disminución progresiva de la firmeza del músculo durante el periodo de almacenamiento (Hobbs, 1982; Huss, 1999).

El tiempo entre el inicio y la resolución del *rigor mortis* depende de diversos factores, tales como la especie, la talla, las condiciones fisiológicas del pez antes de su muerte, el método de captura, la manipulación y la temperatura de almacenamiento (Hobbs, 1982; Huss, 1999). En este contexto, cuanta más cantidad de energía tuviera el pez almacenada en el músculo en el momento de la captura, mayor

sería el periodo para la resolución. Así, en pescado exhausto, como las especies capturadas por arrastre, así como en especies pequeñas, veloces y fatigadas, la fase de *rigor mortis* pasa rápidamente, mientras que en los pescados grandes y en los planos el *rigor mortis* tarda más tiempo en resolverse. Conviene destacar que el efecto de la temperatura sobre el *rigor mortis* no es uniforme; de forma general, el comienzo y la duración del *rigor mortis* en pescado resultan más rápidos a mayor temperatura, aunque en ciertas especies tropicales se ha observado el efecto opuesto (Huss, 1999). El significado tecnológico del *rigor mortis* es de mayor importancia cuando el pescado es fileteado antes o durante esta etapa, ya que el rendimiento del fileteado resulta muy bajo y una manipulación tosca puede causar el desgarramiento de los filetes. A este respecto, si los filetes son separados del hueso antes del *rigor mortis*, el músculo puede contraerse libremente y se encogerá al comenzar esta etapa; sin embargo, si el pescado es cocido antes del *rigor mortis*, su textura será muy suave y pastosa. Por el contrario, cuando el pescado es cocido durante el *rigor mortis* presenta una textura dura, pero no seca. Finalizado el *rigor mortis*, la carne se torna firme, succulenta y elástica (Huss, 1999). A medida que se deteriora el pescado van apareciendo cambios en su olor y sabor debido a la presencia o ausencia de IMP, HxR y Hx, resultantes de los procesos autolíticos del ATP. Aunque la importancia organoléptica de estos productos de degradación autolítica no se comprende en su totalidad, en la actualidad se acepta que el IMP es el responsable del sabor deseable a pescado fresco, solo presente en los productos pesqueros de alta calidad. La HxR es más o menos insípida y la Hx tiene un efecto directo en el sabor amargo percibido en el pescado deteriorado (Huss, 1999; Gil, 2010). Otro factor que puede producir cambios en el sabor y olor del pescado son los procesos de oxidación de la fracción lipídica. A este respecto, el elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados en el pescado lo hace muy susceptible de sufrir procesos de enranciamiento. En el caso de los pescados grasos, estos cambios que conducen a importantes problemas de calidad, como la aparición de sabores y olores rancios.

II.1.5.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO

Debido a la gran variedad de especies de pescado existentes, no existe un único método para determinar la frescura o calidad del pescado. A pesar de que se han propuesto diferentes métodos de evaluación (sensoriales, físicos, químicos y microbiológicos), ninguno de ellos utilizado de forma aislada resulta suficiente para este fin, por lo que se aconseja realizar al menos dos pruebas: una para determinar la pérdida de frescura y otra para detectar el deterioro microbiano (Morales *et al.*, 1996).

II.1.5.4.1. MÉTODOS SENSORIALES

Los métodos sensoriales u organolépticos son aquéllos que utilizan los sentidos para evaluar características del pescado como su aspecto, textura, olor, color y sabor, y valoran los cambios organolépticos que se desarrollan progresivamente en el pescado hasta su deterioro. Estos son los métodos más empleados en sitios de desembarque como lonjas y puertos, y también en los mercados.

Los cambios sensoriales característicos en el pescado *post mortem* varían considerablemente dependiendo de la especie y el método de almacenamiento; sin embargo, se puede detectar un patrón

característico del deterioro del pescado almacenado en hielo, el cual puede ser dividido en cuatro fases (Huss, 1999; Shawyer y Medina, 2005):

- Fase 1. El pescado es muy fresco y tiene sabor a alga marina, dulce y delicada. El sabor puede ser ligeramente metálico.
- Fase 2. Se produce una pérdida del color y del gusto característico. La carne es neutra, sin olores extraños. La textura se mantiene agradable.
- Fase 3. Aparecen signos de deterioro, dependiendo de la especie y tipo de deterioro (aerobio o anaerobio), y se producen una serie de compuestos volátiles de olor desagradable. Uno de estos compuestos es la TMA, que confiere un olor característico al pescado. Al inicio de esta fase pueden aparecer olores y sabores ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en peces grasos. En los últimos estadios de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces como la col, amoniacales, sulfurosos y rancios. La textura se torna suave y aguada o dura y seca.
- Fase 4. El pescado se caracteriza como deteriorado y pútrido.

Existen varios sistemas de puntuación para el análisis sensorial del pescado crudo y la mayoría están basados en los cambios que se producen durante el almacenamiento en hielo (Huss, 1999). En Europa, el método más comúnmente usado es el descrito en el Reglamento (CE) N° 2406/96 del Consejo, de 26 de noviembre de 1996, por el que se establecen normas comunes de comercialización para determinados productos pesqueros. Según este esquema, existen tres niveles de calidad: extra, A y B para, entre otros, pescados blancos y azules. La calificación como extra corresponde a la mayor calidad, mientras que por debajo del nivel B el producto no es apto para consumo humano. Otro tipo de puntuación que se puede emplear es una escala numerada del 0 al 10, donde 10 indica la máxima frescura, 8 corresponde a buena calidad, 6 representa un pescado con sabor neutro (insípido) y 4 es el nivel de rechazo. Usando esta escala, aparece un gráfico característico (Fig. 2.7) donde se observa una rápida degradación del pescado durante la primera y última fase (fases 1 y 4), mientras que en las fases intermedias (fases 2 y 3) la variación es más moderada (Huss, 1999).

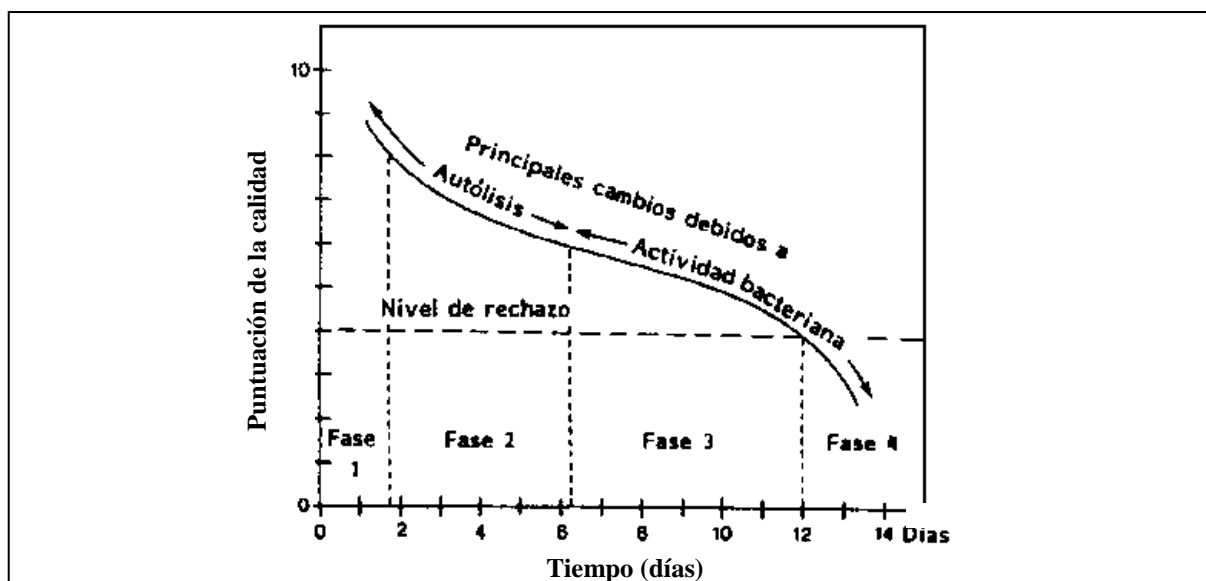


Figura 2.7. Cambios organolépticos en la calidad del bacalao conservado en hielo. Fuente: Huss (1999).

Los métodos sensoriales no requieren equipos ni material especializado, son rápidos y permiten la valoración simultánea de más de un parámetro en diferentes muestras de pescado; sin embargo, el resultado está sometido a las impresiones subjetivas del panel de catadores, hecho que se puede reducir mediante la aplicación de una sistemática adecuada y un entrenamiento continuado de dicho panel.

II.1.5.4.2. MÉTODOS QUÍMICOS

El interés de los métodos químicos para la evaluación de la calidad de los productos pesqueros está relacionado con la capacidad para establecer estándares cuantitativos. En general, estos métodos aportan resultados más objetivos, fiables y seguros, pero requieren en muchos casos de personal experimentado e instrumentación que, en ocasiones, puede tener un coste elevado. Estos métodos son más rápidos que las técnicas microbiológicas; sin embargo, deben tener una correlación con los métodos de evaluación sensorial de la calidad. Además, es recomendable que el compuesto a medir no resulte afectado por los tratamientos tecnológicos aplicados, de forma que pueda ser utilizado tanto para la evaluación de la frescura del pescado sin procesar como del pescado procesado (Huss, 1999).

La mayoría de los métodos químicos utilizados implican el análisis de una sola sustancia o de diferentes sustancias que pertenecen a una misma familia, y por ello se considera mejor determinar más de uno de estos parámetros. A continuación se describen algunos de los métodos químicos más empleados en la actualidad.

II.1.5.4.2.1. Métodos basados en la medida de la degradación del ATP

Entre los cambios bioquímicos *post mortem* que ocurren en el pescado, la degradación del ATP ha sido ampliamente estudiada con el propósito de monitorizar la frescura y vida útil de estos productos. Aunque el catabolismo del ATP sigue la misma secuencia de degradación en la mayoría de las especies de pescado, la velocidad de las reacciones intermediarias varía considerablemente en función de factores tales como la especie, el método de captura, la manipulación a bordo, la temperatura de almacenamiento y las condiciones físicas del pescado, entre otros. Inmediatamente después de la muerte del pez, el ATP se degrada rápidamente a IMP con la formación de ADP y AMP por la actividad de enzimas endógenas. La posterior degradación del IMP a HxR e Hx, en la que participan tanto enzimas endógenas como microbianas, es más lenta y (Ólafsdóttir *et al.*, 1997). Dado que el nivel de cada catabolito intermediario incrementa o disminuye a medida que progresa el deterioro, se han propuesto distintos índices para el análisis de la calidad del pescado basados en la determinación del ATP y sus metabolitos. Entre estos índices, el más empleado es el denominado valor K (Saito *et al.*, 1959), definido como el cociente porcentual de (i) la suma de las concentraciones de HxR y Hx y (ii) la suma de las concentraciones de ATP y todos sus compuestos de degradación. Los valores obtenidos tras la aplicación del índice K permiten clasificar el pescado en distintos grados de frescura (Huss, 1999).

II.1.5.4.2.2. Métodos basados en cambios en la fracción nitrogenada básica

Tanto la actividad bacteriana como las modificaciones bioquímicas resultado de la actividad autolítica del pescado dan lugar a una serie de compuestos nitrogenados básicos como el amoníaco, la

TMA, la DMA y la monometilamina, conocidos en su conjunto como “Nitrógeno Básico Volátil Total” (N-BVT), y considerados representativos de la alteración del pescado (Huidobro y Tejada, 1990). La determinación de N-BVT, llevada a cabo mediante un método sencillo y barato, se utiliza ampliamente en la evaluación de la calidad de los productos pesqueros, puesto que presenta una elevada correlación con el grado organoléptico de aceptación del pescado (Connell, 1995; Huss, 1999). El componente mayoritario de la fracción de N-BVT es la TMA que, como se mencionó anteriormente, es un compuesto originado por la reducción bacteriana del OTMA, al que se considera responsable del característico olor desagradable del pescado cuando comienza su deterioro. Cuando el crecimiento microbiano está inhibido, como en el caso del pescado almacenado a temperaturas de congelación, la enzima OTMA dimetilasa convierte el OTMA en cantidades equimolares de DMA y FA.

Por otra parte, las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo tamaño molecular, presentes en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de diversos procesos metabólicos. En el músculo del pescado, el origen de contenidos elevados de aminas biógenas es el resultado de la actividad aminoácido-descarboxilasa que presentan algunos microorganismos y es por ello que su determinación se ha usado como índice de calidad higiénico-sanitario del pescado. Conviene destacar que la mayoría de las aminas biógenas son termorresistentes, por lo que su determinación permite ampliar la evaluación de la calidad del pescado a derivados en los que su elaboración comporta tratamientos térmicos (Huss, 1999).

II.1.5.4.2.3. Métodos basados en cambios en la fracción lipídica

En general, los métodos basados en el análisis de cambios en la fracción lipídica tienen poca relevancia en la evaluación del pescado fresco debido a que, en la mayoría de los casos, el pescado se considera no apto para el consumo humano antes de que las modificaciones en dicha fracción sean evidentes. Por el contrario, resultan útiles para la evaluación del pescado congelado, ya que la congelación inhibe el crecimiento microbiano pero no evita totalmente ni las modificaciones químicas ni las debidas a enzimas endógenas (Pons, 2005). Los lípidos del pescado, con gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, reaccionan con el oxígeno dando lugar a peróxidos, compuestos inodoros e insípidos. Estos peróxidos pueden posteriormente volverse a oxidar dando lugar a aldehídos y cetonas que confieren al pescado olores y sabores desagradables a rancio (Huss, 1999). Actualmente, se dispone de ensayos para medir ambas fases de la oxidación de lípidos, obteniéndose valores que se relacionan con el grado de rancidez de las distintas especies pesqueras (Pons, 2005).

II.1.5.4.3. MÉTODOS FÍSICOS

Los métodos físicos para la evaluación de la calidad del pescado son generalmente no destructivos, sencillos y de fácil aplicación, por lo que resultan muy útiles en la analítica de rutina y pueden realizarse fuera del laboratorio; sin embargo, la información que ofrecen es a menudo limitada, por lo que suelen utilizarse únicamente como complemento de otras técnicas de evaluación. En la actualidad, existen numerosos métodos físicos para la determinación de la calidad del pescado. A continuación se describen brevemente algunos de los más utilizados.

II.1.5.4.3.1. Determinación del pH muscular

En muchas especies de pescado el pH inicial del músculo *post mortem* es cercano a 7; posteriormente, desciende a valores de 6,5 o inferiores debido a la acumulación de ácido láctico. Estos valores se mantienen durante algunos días y luego aumentan debido a la formación de compuestos básicos (principalmente amonio y aminos) que se generan por la actividad de los microorganismos alterantes (Huss, 1999). La determinación del pH se puede realizar directamente con un pHímetro sobre la masa homogénea de carne de pescado triturada y, en caso de no lograr la homogeneidad o de tratarse de una muestra excesivamente seca, se recomienda hacer una dilución con agua destilada. Aunque se trata de un método rápido que se puede aplicar *in situ*, presenta el inconveniente de ser destructivo. No obstante, conviene considerar que resulta difícil relacionar un determinado valor de pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte del pescado depende de las reservas glucolíticas del pez, en la que influye, entre otros factores, el estado nutricional del pescado y el tipo de captura empleado.

II.1.5.4.3.2. Determinación de las propiedades eléctricas de la carne del pescado

La medida de la resistencia eléctrica de la carne del pescado para evaluar su calidad se basa en el hecho de que las propiedades eléctricas de la piel y el tejido muscular cambian después de la muerte, y esto puede proporcionar un medio para medir el grado de deterioro del pescado. Estos cambios se traducen en una disminución gradual de la resistencia al paso de la corriente eléctrica, atribuible al deterioro de las membranas celulares (Ólafsdóttir *et al.*, 2004). Se han diseñado diversos instrumentos de medición que proporcionan una lectura rápida de la resistencia al paso de la corriente eléctrica y que pueden calibrarse en términos del grado de alteración o de la vida útil que le queda al pescado antes de que sea inadecuado para el consumo humano (Morales *et al.*, 1996). Los valores de aceptabilidad según este método varían en función de la especie de pescado que se está analizando. Estos instrumentos son pequeños, manejables, se colocan directamente sobre el pescado sin dañar la muestra durante la prueba, dan resultados de forma inmediata y se correlacionan bien con los métodos sensoriales, lo que les hace muy útiles en las lonjas, salas de recepción, mercado y otros lugares de control de calidad; sin embargo, muestran el inconveniente de que no son útiles en pescado fileteado ni congelado (Ólafsdóttir *et al.*, 1997).

II.1.5.4.3.3. Determinación de las propiedades de textura

La textura es uno de los factores más importantes a considerar en la calidad del pescado (Botta, 1991; Huss, 1999). La integridad muscular del pescado se debe principalmente a la función de las proteínas estructurales. Así pues, pequeñas modificaciones de estas proteínas pueden producir cambios importantes en la textura del pescado. Existen diversos factores que afectan a la textura como son la especie, la edad, el tamaño del pescado, el estado nutricional y el tipo de músculo (Hyldig y Nielsen, 2001). Asimismo, son sumamente importantes factores *post mortem* como la manipulación a bordo, el procedimiento utilizado para el sacrificio y el perfil de temperatura durante el almacenamiento.

En la industria pesquera, la textura es comúnmente evaluada de manera subjetiva con una prueba que consiste en presionar con el dedo índice la piel del pescado, determinándose la firmeza en función de la dureza y el tiempo durante el que queda la impresión en la muestra (Jellinek, 1985). Asimismo, pueden realizarse mediciones objetivas de las características de textura mediante la utilización de un texturómetro (Botta, 1991), empleando modificaciones de los métodos utilizados en carnes.

II.1.5.4.4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

La actividad de los microorganismos es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco. En este sentido, la finalidad de los métodos microbiológicos es ofrecer información sobre la calidad higiénica durante la manipulación, elaboración o almacenamiento del producto, así como de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública (Morales *et al.*, 1996; Huss, 1997, 1999). Para el análisis microbiológico rutinario del pescado se utilizan habitualmente dos tipos de métodos: (i) recuento del número total de microorganismos, y (ii) recuento de un grupo concreto de microorganismos. A este respecto, la legislación europea (Reglamento (CE) N° 1441/2007, de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios) propone como límites máximos para que el pescado sea considerado como apto para el consumo humano valores de 10^6 ufc/g de bacterias mesófilas o psicrófilas o 10^3 ufc/g de entero bacterias. Un inconveniente de los métodos microbiológicos tradicionales es que normalmente requieren entre 24 h y 3 días para la obtención de resultados; por lo que se han propuesto métodos rápidos, basados generalmente en medidas indirectas de tipo físico-químico que permiten ahorrar tiempo en la obtención de los resultados. Estos métodos rápidos incluyen los basados en técnicas de impedancia, microcalorimetría, turbidimetría, radiometría, microscopía de epifluorescencia directa sobre filtro, bioluminiscencia y diversos métodos inmunoquímicos y genéticos (González *et al.*, 1994a, 1994b). Sin embargo, ninguna de estas metodologías ha tenido aun una aceptación general para la determinación de la frescura del pescado, unos por ser excesivamente costosos, otros por requerir personal especializado y, en otros casos, por no haber demostrado taxativamente su eficacia.

II.1.6. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

El pescado, como producto altamente perecedero, requiere tanto un transporte eficiente como instalaciones avanzadas de almacenamiento, elaboración y envasado. Asimismo, son precisas técnicas de adecuadas de conservación para preservar su calidad nutricional, ampliar su vida útil, reducir al mínimo el deterioro causado por microorganismos y evitar las pérdidas por una manipulación inadecuada. En este sentido, los avances producidos en los últimos decenios en lo que se refiere tanto al envasado como a la refrigeración, transporte y producción de hielo han resultado en una mejora de la calidad de los productos ofrecidos al consumidor.

Además, el pescado es muy versátil ya que tiene una capacidad notable para ser elaborado y transformado en una amplia gama de productos que aumentan su valor económico. Así, el pescado puede distribuirse vivo, fresco, refrigerado, congelado, sometido a tratamiento térmico, fermentado, seco, ahumado, salado, encurtido, hervido, frito, liofilizado, picado, en polvo o enlatado, o como combinación de dos o más de estas formas. Según datos de la FAO (2012), en 2010, el pescado destinado al consumo humano directo se comercializó principalmente vivo, fresco o refrigerado (46,9%), seguido del pescado congelado (29,3%), elaborado o en conserva (14%) y curado (9,8%). Mientras que el pescado curado (seco, ahumado o fermentado) sigue siendo un método tradicional de venta al por menor y consumo en los países en vías de desarrollo, en los países desarrollados, la mayor parte de la producción destinada al consumo humano se comercializa como pescado congelado, elaborado o en conserva (FAO, 2012).

II.1.6.1. PESCADO COMERCIALIZADO VIVO

El pescado vivo es especialmente apreciado en Asia (principalmente por la población china) y en mercados especializados de otros países, fundamentalmente en comunidades de inmigrantes asiáticos. La comercialización de pescado vivo se ha incrementado en los últimos años como consecuencia de los avances tecnológicos, la mejora de la logística y la creciente demanda por parte del consumidor. Se ha creado una compleja red de explotaciones acuícolas e instalaciones de manipulación, transporte, distribución y exhibición para apoyar la comercialización de peces vivos. Entre los nuevos sistemas tecnológicos, cabe citar los contenedores o estanques diseñados específicamente a estos efectos, así como camiones y otros medios de transporte equipados con instalaciones de aireación u oxigenación para mantener vivos a los peces durante el transporte, en las explotaciones acuícolas o en los lugares de exhibición. Si bien en algunas zonas del sudeste de Asia, la comercialización y el comercio de estos productos no está regulado oficialmente, en mercados como la UE, el pescado vivo tiene que cumplir una serie de requisitos sobre distintos aspectos, entre ellos, el bienestar de los animales durante el transporte (FAO, 2012).

II.1.6.2. REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN

La descomposición del pescado y los productos de la pesca es causada principalmente por la actividad enzimática y bacteriana (sección II.1.5.3), por lo que una forma de retrasar esa actividad consiste en la disminución de la temperatura con el propósito de que los microorganismos y/o enzimas no actúen o actúen muy lentamente (Graham *et al.*, 1993; Huss, 1999; Maddison *et al.*, 1999; Shawyer y Medina, 2005; Durazo, 2006). Por consiguiente, el uso de técnicas de enfriamiento, como la refrigeración o la congelación (Tabla II.12), posibilita un aumento de las capturas así como un aumento efectivo de la duración de las mismas, lo que supone un beneficio económico. Los productos que lleguen al mercado en buenas condiciones de conservación alcanzarán generalmente precios más altos, tanto en el comercio mayorista como minorista, y generarán, en consecuencia, un mayor rendimiento económico de la actividad pesquera (Shawyer y Medina, 2005). El uso de bajas temperaturas como técnica de conservación del pescado se puede dividir en:

1. Refrigeración. La refrigeración se define como la conservación de los alimentos a temperaturas inferiores a 10°C y superiores al punto de congelación de los alimentos, que para el pescado y productos de la pesca es de -2°C (Durazo, 2006). La refrigeración se puede realizar con hielo, hielo y agua (de mar o dulce), agua de mar refrigerada (AMR) y/o con aire frío, pero se debe considerar que, sea cual sea el tipo de agua utilizada, va a ponerse en contacto con el alimento, y por ello es imprescindible que esté libre de cualquier tipo de contaminante que pueda poner en peligro la salud humana. Hay que tener en cuenta que mediante la refrigeración, el proceso de alteración del pescado y los productos de la pesca no se detiene, sino que sólo se ralentiza (Shawyer y Medina, 2005; Durazo, 2006).
2. Congelación. La congelación de los productos pesqueros es el proceso mediante el cual la temperatura de todo el producto desciende por debajo de su temperatura de congelación. Este proceso tiene como finalidad obtener productos que puedan almacenarse por un tiempo prolongado, y que después de la descongelación los cambios en su calidad y aceptación por parte del consumidor sean mínimos. La calidad de los productos de la pesca congelados se ve influenciada por factores como la composición del producto, manipulación y tratamientos previos al congelado, método de congelación y ambiente en el que se encuentre el producto congelado durante su almacenamiento y congelación. De acuerdo con la velocidad de congelación, ésta se puede dividir en: (i) congelación lenta: cuando el descenso de la temperatura se realiza lentamente, se forman pocos puntos de cristalización para el agua por lo que sus moléculas tienen tiempo de depositarse en cristales relativamente grandes que van a dañar las membranas de las células, y (ii) congelación rápida: cuando el agua de los tejidos se congela rápidamente, se constituyen más puntos de cristalización, los cristales de hielo son de menores dimensiones y se evita la destrucción de la estructura tisular (Maddison *et al.*, 1999; Durazo, 2006).

Tabla II.12. Ventajas e inconvenientes de la refrigeración y congelación del pescado.

Refrigeración	Congelación
Almacenamiento a corto plazo (hasta un máximo de un mes para algunas especies, sólo unos pocos días para otras)	Almacenamiento a largo plazo (un año o más para algunas especies)
Temperatura de almacenamiento 0°C	Temperatura de almacenamiento muy inferior a cero, por ejemplo -30 °C
Relativamente barato	Relativamente caro
El producto es similar al pescado fresco	Si se realiza de forma incorrecta, puede afectar negativamente a la calidad
Tecnología relativamente sencilla	Tecnología relativamente compleja
No se necesitan conocimientos avanzados	Se necesitan conocimientos avanzados
Refrigeración portátil	Operaciones generalmente fijas

Adaptado de Shawyer y Medina (2005).

II.1.6.3. SALAZÓN

La conservación del pescado mediante salado es una de las técnicas más antiguas utilizadas por el hombre (sección II.1.1). Durante el proceso de salado, la composición química y el peso del pescado experimentan considerables cambios, originados principalmente por el incremento de los niveles de sal en el músculo y la consiguiente reducción en el contenido de agua (Maddison *et al.*, 1999; Durazo, 2006; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Los factores que influyen en las características de los productos conservados mediante salado son: (i) pureza y contenido microbiano de la sal; (ii) tamaño del grano de sal; (iii) concentración salina; (iv) contenido graso del pescado; (v) tamaño y tipo de corte del pescado; (vi) frescura del pescado, y (vii) tipo y tiempo del salado (Durezo, 2006).

El salado del pescado se puede realizar de tres maneras diferentes:

1. Salado en seco (*kench salting*). Es uno de los métodos más populares de salado, utilizado sobre todo en pescados con escaso contenido graso, como por ejemplo el bacalao. El pescado es descabezado, eviscerado y abierto en mariposa y apilado sobre sal sólida. Sobre el pescado se coloca otra capa de sal y así sucesivamente formando una pila de dos metros como máximo. Este proceso tiene una duración variable dependiendo del tipo de producto (de una a ocho semanas) y cada cierto tiempo hay que cambiar la posición del pescado para que el salado sea uniforme. Dependiendo del tipo de salado que se quiera conseguir, la proporción de sal/producto es variable. Para un salado ligero se usa la proporción una parte de sal por ocho de pescado, y para un salado fuerte, una parte de sal por tres de pescado. Otros factores, como el grosor y la temperatura, determinan también la velocidad de penetración de la sal, si bien es conveniente realizar el proceso a una temperatura inferior a 15°C con el fin de evitar la putrefacción. Finalmente, el producto así obtenido puede lanzarse al mercado o bien someterse a un proceso de manipulación y secado previo a su distribución (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).
2. Salado húmedo (*brine salting*). Este proceso es muy utilizado para el salado de pescados grasos, tales como la caballa, debido a que la accesibilidad del oxígeno al contenido graso se ve reducida, y con ello la posibilidad de que se produzca la rancidez oxidativa. Las piezas de pescado se sumergen en soluciones de sal en agua (salmuera), y se dejan durante un determinado período de tiempo hasta que se alcance el equilibrio entre el contenido de sal del músculo y de la salmuera. Este tipo de salado produce una disminución de la firmeza del pescado, un incremento en la capacidad de retención de agua y una disminución del contenido en proteína soluble debido a la liberación de proteína a la salmuera. La cantidad de sal absorbida por el músculo del pescado va a depender de diversos factores, como la duración del proceso, la temperatura, el pH y, sobre todo, la concentración de sal presente en la salmuera. A este respecto, se recomiendan temperaturas de 4-5°C para conseguir un producto con una buena calidad microbiológica y un pH inicial básico para facilitar la entrada de sal en el músculo y la salida de agua y proteína a la salmuera. Una vez finalizado el salmuerado, el pescado se lava para eliminar la sal presente en la superficie (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

3. Salado mixto (*pickled salting*). Este proceso, utilizado por ejemplo en el salado de anchoas consiste en salar las piezas de pescado en seco en un barril o depósito con sal. Al cabo de un tiempo, de la pila escurre una salmuera que permanece en contacto con el pescado dentro del barril o recipiente. Después de varios días, se suele añadir una salmuera líquida saturada. Una vez finalizado el proceso de salado (aprox., tres semanas) las piezas de pescado se secan hasta alcanzar un 35% de agua y un 28% de sal (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

Normalmente, el proceso de salado se suele combinar con un posterior proceso de secado para disminuir aún más el contenido acuoso del producto. El método más conocido de secado consiste en la eliminación del agua del pescado salado por evaporación. Como paso previo, la capa de sal que se encuentra sobre el pescado es eliminada con agua, la cual es posteriormente drenada. Además de los citados, existen otros métodos de secado, como son la absorción del agua del producto por materiales absorbentes y la aplicación de presiones mecánicas (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

II.1.6.4. AHUMADO

El ahumado consiste en exponer el producto pesquero, generalmente salado, a la acción del humo obtenido de la combustión incompleta de madera o material leñoso no resinoso, con la finalidad de reducir su contenido de humedad e introducir en el alimento compuestos diversos procedentes de la combustión (Storey, 1982; Durazo, 2006). El ahumado tiene diversos efectos sobre los productos pesqueros, entre los que destacan la aromatización, coloración y conservación. La acción de conservación del humo se asocia a: (i) la destrucción y/o inhibición de los microorganismos, principalmente por la acción de fenoles y formaldehído; (ii) al secado, ya que disminuye la actividad de agua (a_w) del producto, y (iii) al efecto antioxidante, asociado a compuestos fenólicos que retardan la autooxidación de los lípidos (Storey, 1982; Durazo, 2006). En general, y de acuerdo con la temperatura de procesado, el ahumado puede dividirse en ahumado en frío y ahumado en caliente. El ahumado en frío se caracteriza porque el producto es procesado a una temperatura máxima de 38°C con una duración que oscila entre 24 horas y 10 días; sin embargo, en el ahumado en caliente se emplean temperaturas de 80–90°C siendo la operación completada en 4–12 horas (Maddison *et al.*, 1999; Durazo, 2006).

Con el fin de evitar riesgos por la presencia de bacterias patógenas en productos pesqueros ahumados, se recomienda que los productos ahumados en frío contengan 2,5% de sal en la fase acuosa o que presenten una a_w menor de 0,93; mientras que los productos ahumados en caliente deberán de ser sometidos a un proceso térmico de 83°C/30 min o contener 3,5% de sal en la fase acuosa (Durazo, 2006).

II.1.6.5. MARINADO

Este método de conservación del pescado a través del curado ácido data del siglo VII a. C. Se denominan marinados a todos aquellos productos que se curan con ácido acético u otros ácidos comestibles, sal, y, en algunas ocasiones, especias. Dependiendo del líquido en el que se sumerja el producto, el marinado puede tener otros nombres más específicos. Así, si se sumerge en ácido acético se

denomina escabeche (denominación típica de la cocina española), si es en zumo de limón se denomina cebiche (denominación típica de cocinas latinoamericanas) y si es en una mezcla de aceite y pimentón (dulce o picante) se denomina adobo (generalmente realizado en carnes). El efecto conservador del marinado se debe a la acción conjunta del ácido y la sal, y en ocasiones la refrigeración, factores que retrasan la actividad bacteriana y enzimática; sin embargo, algunas enzimas y bacterias permanecen activas durante el curado, dando como resultado productos con olor y sabor típicos (McLay, 1972; Durazo, 2006).

De acuerdo con su forma de preparación, los productos marinados son estables por un periodo de tiempo limitado. Si son envasados en frío y sin vacío, pueden presentar una estabilidad de 2–4 semanas a temperatura ambiente; sin embargo, si se conservan a temperaturas de refrigeración, la vida útil se incrementa hasta las 6–8 semanas. Por otra parte, si se envasan en caliente presentan mayor estabilidad debido a la formación de un vacío parcial en el envase, mientras que los productos envasados a vacío se pueden conservar aptos para el consumo, a temperatura ambiente, por un periodo de tiempo aproximado de tres años (Durazo, 2006).

II.1.6.6. FERMENTACIÓN

El pescado fermentado tiene una larga historia de uso en Europa, en la que está asociado principalmente a los países escandinavos, y en el sudeste asiático, donde existe una gran variedad de productos (Tabla II.13). El *garum* era un producto muy apreciado por los romanos (sección II.1.1) que consistía en una pasta o salsa de pescado fermentado y autolisado (Hall, 2002). Los productos *gaffelbitar*, *tidbits* y *surstromming* son productos típicos de los países escandinavos que consisten en arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) fermentado, mientras que el producto *rakefisk* consiste en trucha (*Salmo trutta*) fermentada. Para la obtención de *gaffelbitar* y *tidbits*, el pescado es fermentado durante 12–18 meses con una mezcla de sal, azúcar y especias, tras lo que se somete a fileteado y envasado para su venta. El desarrollo del sabor típico de estos productos es debido fundamentalmente a la actividad enzimática y a la acción de microorganismos, principalmente bacterias lácticas como, por ejemplo, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. o *Leuconostoc* spp. Por otra parte, los productos *surstromming* y *rakefisk* son fermentados con sal durante un periodo de tiempo corto (máximo dos semanas) hasta que se genera un aroma muy fuerte debido a la producción de metil mercaptano (Hall, 2002).

Por otra parte, el pescado fermentado es muy típico del sudeste asiático, donde existe una gran variedad de productos con una amplia distribución. Algunos países utilizan pescado y crustáceos como materia prima principal, mientras que otros utilizan otro tipo de productos pesqueros. En algunos casos, los productos son dependientes de la especie de pescado; sin embargo, en otros, se utilizan las especies disponibles. Productos similares pueden tener una denominación diferente en los distintos países asiáticos, o bien, tener el mismo nombre en distintos países. Algunas características comunes de estos productos pesqueros fermentados son el empleo de especies pequeñas y estacionales, diferentes de las principales especies comestibles, la utilización de cantidades variables de sal y, en ocasiones, la adición

de fuentes de hidratos de carbono, especialmente arroz, durante la fermentación del producto. Puesto que la producción de pescado fermentado es bastante sencilla y barata y que la sal y las bacterias lácticas implicadas en el proceso confieren a estos productos una vida útil aceptable, estos alimentos constituyen la base de la dieta de una gran parte de la población de estos países (Hall, 2002).

Tabla II.13. Productos de pescado fermentado.

Producto	País	Especie de pescado
<i>Nuoc-mam</i>	Vietnam	<i>Stylephorus</i> spp., <i>Engraulis</i> spp., <i>Rastrelliger</i> spp.
<i>Patis</i>	Filipinas	<i>Stylephorus</i> spp., <i>Leiognathus</i> spp., <i>Sardinella</i> spp.
<i>Nam-pla</i>	Tailandia	<i>Stylephorus</i> spp., <i>Rastrelliger</i> spp.
<i>Ketjap-ikan</i>	Indonesia	<i>Stylephorus</i> spp., <i>Leiognathus</i> spp., <i>Clupeidae</i>
<i>Budu</i>	Malasia	<i>Setipinna taty</i> (Ikan-bilis)
<i>Bagoong</i>	Filipinas	<i>Engraulis</i> spp., <i>Clupeidae</i> y gambas
<i>Trassi</i>	Indonesia	Gambas
<i>Belachan</i>	Malasia	Gambas
<i>Plaa-som</i>	Tailandia	Pescados de agua dulce
<i>Prahoc</i>	Camboya	Pescados de agua dulce
<i>Gaffelbitar</i>	Países escandinavos	<i>Clupea harengus</i>
<i>Tidbits</i>	Países escandinavos	<i>C. harengus</i>
<i>Surstromming</i>	Países escandinavos	<i>C. harengus</i>
<i>Rakefisk</i>	Países escandinavos	<i>Salmo trutta</i>

Adaptado de Hall (2002).

II.2. BACTERIAS LÁCTICAS

II.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico, fisiológico y filogenético, pertenecientes al grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C <55 mol%), con exigentes requerimientos nutritivos y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono (sección II.4.1, Fig. 2.15). En general, las bacterias lácticas son microorganismos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, catalasa-negativos, carentes de citocromos, microaerófilos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes y estrictamente fermentativos (Stiles y

Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002; von Wright y Axelsson, 2012).

En la actualidad, los géneros bacterianos comprendidos en el grupo de las bacterias lácticas pertenecen a la familia *Lactobacillales*, orden *Bacilli* del filo *Firmicutes* y son los siguientes: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Tabla II.14) (Pot *et al.*, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c, 2001; Claesson *et al.*, 2007; Ogier y Serror, 2008; Ogier *et al.*, 2008; de Vos *et al.*, 2009). Tradicionalmente, también se consideraba al género *Bifidobacterium* como perteneciente al grupo de las bacterias lácticas ya que posee las características morfológicas y fisiológicas de este grupo microbiano; no obstante, las bifidobacterias están más relacionadas filogenéticamente con el grupo actinomiceto de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C >55 mol%) y además poseen una ruta especial para la fermentación de los azúcares, específica para este género (catalizada por la enzima fructosa-6-fostato fosfocetolasa), lo que las separa claramente del grupo de las bacterias lácticas (Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c).

Las bacterias lácticas se localizan en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de hidratos de carbono solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, como pueden ser diversos alimentos como la leche y los productos lácteos, la carne y los productos cárnicos fermentados, el pescado y los derivados de la pesca, las frutas y hortalizas frescas y los productos vegetales fermentados, los ensilados y diversas bebidas. Sin embargo, estos microorganismos también forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital y de las mucosas de los mamíferos. Además, algunas bacterias lácticas también se han aislado del estiércol y de las aguas residuales urbanas e industriales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002; von Wright y Axelsson, 2012).

II.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas, además de su función tecnológica, poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes potencialmente en los alimentos. El efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las bacterias lácticas también producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular, y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Daeschel, 1989; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992; de Vuyst y Vandamme, 1994b; Adams y Nicolaidis, 1997; Cintas y Casaus, 1998; Ouwehand, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Cintas *et al.*, 2000a, b, 2001; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006;

Galvez *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2012). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente para la bioconservación de los alimentos (sección II.3.3.10.1.1), ya que por su naturaleza proteica podrían ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal mientras que permanecerían activas en los sustratos alimenticios y, además, no parecen ser tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996, Cintas *et al.*, 2000b).

Tabla II.14. Esquema taxonómico del orden *Lactobacillales*.

Filo			
Clase			
Orden	Familia	Género ^a	
<i>Firmicutes</i>			
<i>Bacilli</i>			
<i>Lactobacillales</i>	1 <i>Lactobacillaceae</i>	I. <u><i>Lactobacillus</i></u> II. <u><i>Paralactobacillus</i></u> III. <u><i>Pediococcus</i></u>	
	2 <i>Aerococcaceae</i>	I. <u><i>Aerococcus</i></u> II. <i>Abiotrophia</i> III. <i>Dolosicoccus</i> IV. <i>Eremococcus</i> V. <i>Facklamia</i> VI. <u><i>Globicatella</i></u> VII. <i>Ignavigranum</i>	
	3 <i>Carnobacteriaceae</i>	I. <u><i>Carnobacterium</i></u> II. <i>Alkalibacterium</i> III. <i>Allofustis</i> IV. <u><i>Alloicoccus</i></u> V. <i>Atopobacter</i> VI. <i>Atopococcus</i> VII. <i>Atopostipes</i> VIII. <i>Desemzia</i> IX. <u><i>Dolosigranulum</i></u> X. <i>Granulicatella</i> XI. <i>Isobaculum</i> XII. <i>Marinilactibacillus</i> XIII. <i>Trichococcus</i>	
	4 <i>Enterococcaceae</i>	I. <u><i>Enterococcus</i></u> II. <i>Melissococcus</i> III. <u><i>Tetragenococcus</i></u> IV. <u><i>Vagococcus</i></u>	
	5 <i>Leuconostocaceae</i>	I. <u><i>Leuconostoc</i></u> II. <u><i>Oenococcus</i></u> III. <u><i>Weissella</i></u>	
	6 <i>Streptococcaceae</i>	I. <u><i>Streptococcus</i></u> II. <u><i>Lactococcus</i></u> III. <i>Lactovum</i>	

^aLos géneros pertenecientes al grupo de bacterias lácticas están subrayados.
Adaptado de de Vos *et al.* (2009)

II.2.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas son microorganismos de gran importancia no sólo en la industria alimentaria, por su aplicación en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados, sino también en la industria farmacéutica, ya que son la base de la mayoría de las preparaciones probióticas (secciones II.2.3.2.1 y II.4.2.2.1). Además, las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción de sustancias de interés para las industrias alimentaria y farmacéutica (e.g., péptidos, proteínas, sustancias “nutracéuticas” y vacunas orales) (secciones II.2.3.2.2 y II.2.3.2.3). Tampoco conviene olvidar el efecto nutricional y saludable de la ingestión de bacterias lácticas viables en los consumidores. A este respecto, se ha hipotetizado, y algunas veces demostrado, que las bacterias lácticas incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, contribuyen a inhibir el desarrollo de algunos tipos de cáncer, poseen actividad antimutagénica, modulan la respuesta inmune mediada por células, reducen los niveles de colesterol sanguíneo e incluso regulan la respuesta emocional a través de alteraciones de la expresión de receptores del ácido γ -amino butírico (GABA, del inglés *Gamma-Amino Butyric Acid*) (Bravo *et al.*, 2011; Barret *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2012; Stolaki *et al.*, 2012; Bested *et al.*, 2013). No obstante, también se ha relacionado a las bacterias lácticas con la alteración de diversos alimentos, la formación de aminas biógenas e, incluso, con la producción de enfermedades (secciones II.2.3.1.1 y II.2.3.3) (Aguirre y Collins, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994a; Konings *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Hugenholtz *et al.*, 2002; von Wright y Axelsson, 2012).

II.2.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS

Los alimentos fermentados han sido consumidos por la humanidad desde tiempos inmemoriales y parecen tener su origen en la civilización Sumeria (5.000–4.000 a.C.). Tradicionalmente, estos alimentos fermentados se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microbiota presente de forma natural en las materias primas (fermentaciones naturales) (Cintas y Casaus, 1998). En la actualidad, estos productos incluyen más de 3.500 variedades, elaboradas a partir de materias primas como la leche, frutas, vegetales, raíces, cereales, carne y pescado, entre los que pueden citarse: (i) derivados de la leche fermentada (e.g., queso, yogur y kéfir); (ii) pan y derivados de cereales fermentados (e.g., *sourdough* [derivado de diversos cereales] y *ogi* [derivado del maíz o sorgo]); (iii) bebidas (e.g., vino, cerveza y diversos licores); (iv) derivados de vegetales fermentados (e.g., ensilados, *kimchi* [derivado de la col y otros vegetales], *sauerkraut* [derivado de la col] y *tempeh* [derivado de la soja]), y (v) derivados del pescado fermentado. Sin embargo, hasta mediados del siglo XIX Pasteur no demostró que los microorganismos eran los responsables de los procesos fermentativos que tenían lugar en todos estos alimentos (Stiles, 1996; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Ross *et al.*, 2002; Park y Kim, 2012; Salovaara y Gänzle, 2012; Franz y Holzapfel, 2012).

Actualmente, las fermentaciones industriales son procesos estrictamente controlados basados en la adición deliberada a la materia prima de cultivos de microorganismos específicos vivos (bacterias,

hongos y/o levaduras) (Tabla II.15), lo que permite garantizar y estandarizar las características organolépticas y reológicas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria y alargar su vida útil (Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2000a). Además, el empleo de la fermentación como tecnología alimentaria cumple varias funciones: (i) enriquecimiento de la dieta humana debido a la amplia diversidad de alimentos generados; (ii) conservación de los alimentos derivada de la fermentación láctica, alcohólica o acética; (iii) enriquecimiento de las materias primas con vitaminas, proteínas y aminoácidos y ácidos grasos esenciales; (iv) detoxificación, y (v) descenso del tiempo requerido para su preparación (Steinkraus, 2002; Giraffa, 2004). Estos microorganismos, que se añaden a las materias primas para la obtención de alimentos fermentados, pueden clasificarse en función de su finalidad principal en: (i) cultivos iniciadores, que se adicionan para inducir cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, permitiendo así la obtención de unos productos finales con unas características organolépticas y reológicas diferentes y deseables (Buckenhüskes, 1993; Geisen y Holzapfel, 1996; Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998; Hugas, 1998; Lücke, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Tamine, 2002; Leroy y de Vuyst, 2004; Smit *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006); (ii) cultivos protectores, adicionados para garantizar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad de los alimentos, así como para incrementar su vida útil, mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos debido a la competencia por los nutrientes del sustrato y la producción de diversos metabolitos (sección II.2.2) (Holzapfel *et al.*, 1995; Geisen y Holzapfel, 1996; Lücke, 2000; Rodgers, 2001; Rodgers *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Työppönen *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004), y (iii) cultivos adjuntos (también denominados cultivos iniciadores adjuntos), adicionados con una finalidad distinta a las anteriores, como puede ser la aceleración de la maduración mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores durante la elaboración de determinados tipos de quesos y la producción del sabor y aroma deseado (O'Sullivan *et al.*, 2002a).

II.2.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos

La actividad metabólica de las bacterias lácticas provoca, en algunas ocasiones, la alteración de determinados alimentos cuando estos microorganismos se convierten en la microbiota dominante durante su almacenamiento, como es el caso de: (i) carnes o pescados envasados en condiciones de anaerobiosis o atmósferas modificadas, en las que producen acidez, sabores y olores defectuosos, exudados lechosos y limosidad, la hinchazón de los envases por producción de gas y decoloración (Borch *et al.*, 1996; Björkroth *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Joffraud *et al.*, 2001; Lyhs *et al.*, 2001; Vermeiren *et al.*, 2004; Lyhs y Björkroth, 2008); (ii) ciertos vinos en los que la fermentación maloláctica es indeseable, ya que producen agriado, sabores defectuosos, turbidez, lodos, decoloración y viscosidad; estas alteraciones también pueden producirse por el desarrollo de otras bacterias lácticas que no intervienen en la fermentación maloláctica (Daeschel *et al.*, 1991; Fleet, 1999, 2001), y (iii) cervezas, en las que provocan la aparición de acidez excesiva, sabores y aromas defectuosos, turbidez, filamentosidad, sedimentos, viscosidad y decoloración (Jespersen y Jakobsen, 1996; Campbell, 1997; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March *et al.*, 2005).

Tabla II.15. Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos.

	Producto	Microorganismos	Sustrato
Bebidas	Cerveza y vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Cereales, lúpulo y uvas
	<i>Mahewu</i> (Sudáfrica)	Bacterias lácticas	Maíz
Carne	Embutidos fermentados	Bacterias: <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Streptococcus carnosus</i> y <i>Micrococcus varians</i> Levaduras: <i>Debaromyces hansenii</i> y <i>Candida famata</i> Mohos: <i>Penicillium nalgiovense</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Carne de ternera y de cerdo
Cereales	Pan	<i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Trigo, centeno y otros cereales
	<i>Idli</i> (India)	<i>Torulopsis</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Trichosporon pullulans</i> y bacterias lácticas	Arroz y lentejas
	<i>Nan</i> (India)	<i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Harina de trigo
	<i>Ogi</i> (Nigeria)	Bacterias lácticas, hongos y levaduras	Maíz
Leche	Queso	Bacterias: <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Propionibacterium</i> spp. Mohos (<i>Penicillium roqueforti</i> en quesos azules) y levaduras	Leche
	Yogur	<i>St. thermophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
	Kéfir	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> y <i>Torulla</i> spp.	Leche
	Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
	Pescado	<i>C. piscicola</i> y <i>Carnobacterium divergens</i>	Pescado
Postres	<i>Bongkrek</i> (Indonesia)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Coco
	<i>Oncom</i> (Indonesia)	<i>Neurospora intermedia</i> o <i>R. oligosporus</i>	Cacahuete
Vegetales y frutas	Salsa de soja	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Haba de soja y trigo
	<i>Sauerkraut</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lc. lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Col, repollo
	<i>Gari</i> (África)	<i>Corynebacterium manihot</i> y bacterias lácticas	Raíz de cassava
	<i>Kimchi</i> (Korea)	Bacterias lácticas	Col, repollo
	<i>Tempeh</i> (Indonesia)	<i>R. oligosporus</i>	Haba de soja
	<i>Pickles</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> y <i>Lb. plantarum</i>	Pepinillo en vinagre
	Aceitunas	<i>Le. mesenteroides</i> y <i>Lb. plantarum</i>	Aceitunas
	Zumos	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> y <i>Le. mesenteroides</i>	Fruta

Adaptado de Caplice y Fitzgerald (1999) y Ross et al. (2002).

Por otra parte, las enzimas descarboxilasas de algunas bacterias lácticas presentes en los alimentos pueden provocar la formación de aminas biógenas (e.g., histamina, tiramina, putrescina y cadaverina), que son sustancias psico- y vasoactivas. A este respecto, conviene destacar que, a pesar de que la presencia de estas sustancias es común en los alimentos fermentados (e.g., queso, vino, cerveza y embutidos crudos curados), su ingestión en grandes cantidades, o en cantidades normales por las personas sensibles, puede originar cuadros toxicológicos (náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, cefaleas, erupciones cutáneas e hiper- o hipotensión) (Giraffa, 2002; Suzzi y Gardini, 2003). Asimismo, algunas especies de pescado están asociadas a un alto contenido de histidina (e.g., atún, bonito, caballa, salmón, sardina y arenque), y por ello la UE, mediante el Reglamento (CE) N° 1441/2007, de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ha establecido un límite máximo del contenido de histamina (200 mg/kg) para especies de pescado pertenecientes a las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombrosidae*. En condiciones inadecuadas de conservación o refrigeración, la musculatura de estos peces de carne oscura sufre descomposición bacteriana produciéndose la descarboxilación de la histidina, y consecuentemente, la formación de histamina. La ingestión de pescado con altas concentraciones de esta amina biógena puede dar lugar a lo que se denomina intoxicación por escómbridos o escombroidosis, siendo ésta una de las formas más frecuentes de intoxicación por pescado y cuyos síntomas recuerdan a una reacción alérgica (Hijano Baola *et al.*, 2005; Muñoz-Atienza *et al.*, 2011).

II.2.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD

II.2.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos

La definición del término probiótico varía según la fuente consultada; así pues, la FAO/WHO (2002) define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador”. De acuerdo con esta definición, la viabilidad es un requerimiento esencial en una preparación probiótica; sin embargo, microorganismos inactivados, así como componentes aislados y/o metabolitos de los probióticos, han demostrado asimismo poseer ciertos efectos beneficiosos (Ouwehand y Salminen, 1998; Lahtinen y Endo, 2012). Por ello, actualmente el término probiótico engloba a cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos y a componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y el bienestar del hospedador, en algunos casos como consecuencia de la mejora de las propiedades de su microbiota indígena (Salminen *et al.*, 1999; Shortt, 1999). La mayoría de las preparaciones probióticas (especialidades farmacéuticas), de los alimentos probióticos (alimentos infantiles, leche y derivados lácteos) y de los aditivos alimentarios para animales incluyen microorganismos del género *Bifidobacterium* y del grupo de las bacterias lácticas, principalmente del género *Lactobacillus* (sección II.4.2.2.1). Sin embargo, algunas cepas de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* también se emplean ocasionalmente como probióticos en humanos y animales, respectivamente (Holzapfel *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Holzapfel y Schillinger, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Stolaki *et al.*, 2012). En este contexto, la

elección de cepas bacterianas para su empleo como probióticos se basa en el aislamiento de microorganismos comensales de las mucosas oral, gastrointestinal y genitourinaria de individuos sanos de la misma especie, así como en la selección posterior de los microorganismos con potencial probiótico que cumplan los siguientes requisitos: (i) tolerancia a bajos niveles de pH, al jugo gástrico y a las sales biliares; (ii) adherencia a células intestinales e inmunoestimulación; (iii) proliferación y colonización del tracto gastrointestinal; (iv) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas o a través de mecanismos de exclusión competitiva; (v) seguridad e inocuidad (microorganismos genéticamente estables, no patogénicos, no tóxicos, no alergénicos y no mutagénicos o carcinogénicos); (vi) ausencia de factores de virulencia y de resistencias adquiridas a antibióticos, y (vii) supervivencia, viabilidad y crecimiento durante la elaboración, transporte y almacenamiento de los alimentos e interacción con cultivos iniciadores y/o sustancias prebióticas (Salminen *et al.*, 1996; Saarela *et al.*, 2000; Gardiner *et al.*, 2002; Martín, 2005; Gueimonde *et al.*, 2012).

Por otra parte, entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos se incluyen: (i) mantenimiento y restauración de la microbiota intestinal normal, previniendo y reduciendo las alteraciones gastrointestinales; (ii) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos; (iii) fortalecimiento de la barrera de la mucosa intestinal; (iv) actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas; (v) modulación del sistema inmune; (vi) reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (vii) actividad antioxidante; (viii) mejora en la absorción del calcio; (ix) aumento de la síntesis de vitaminas y mejora de la predigestión de proteínas; (x) acción antihipertensiva; (xi) disminución de las infecciones urogenitales y de las úlceras causadas por *H. pylori*; (xii) tratamiento de las diarreas causadas por viajes a zonas tropicales y tratamiento excesivo con antibióticos; (xiii) control de colitis provocada por rotavirus y *Cl. difficile*; (xiv) mejora de la calidad nutritiva de los alimentos; (xv) mejora de la digestibilidad de la lactosa; (xvi) modulación del estrés y mejora de los síntomas de ansiedad, y (xvii) regulación de la respuesta emocional (Holzapfel *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 2002; Holzapfel y Schillinger, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2003; Amores *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ljungh y Wadström, 2006; Bujalance *et al.*, 2007; Falagas *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Silk *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2009; Bravo *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2012; Lyra *et al.*, 2012; Miller y Reid, 2012; Szajewska, 2012).

II.2.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales

Mediante ingeniería genética es posible obtener bacterias lácticas recombinantes que expresen, intra, extracelularmente o unidos a la superficie celular, epítomos o determinantes antigénicos (región específica de un antígeno reconocida por los anticuerpos) de microorganismos patógenos y que, por lo tanto, puedan utilizarse como vacunas administradas por vía oral. El hecho de que las bacterias lácticas sean candidatas para el desarrollo de vacunas orales se deriva de algunas de sus propiedades como: (i) su consideración, generalmente, como microorganismos seguros o de grado alimentario (GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*) término propuesto por la Administración de Medicamentos y Alimentos americana (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*), o su equivalente europeo de presunción

cualificada de seguridad (QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*), sugerido recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) (EFSA, 2004; EFSA, 2005b; EFSA, 2007; EFSA, 2011); (ii) sus propiedades adyuvantes (potenciadoras de la respuesta inmune); (iii) su baja capacidad de provocar una respuesta inmune intrínseca; (iv) su capacidad de adherencia y colonización de las mucosas, y (v) su resistencia a valores de pH ácidos (Pouwels *et al.*, 1998; Dieye *et al.*, 2003; Wells y Mercenier, 2003; Hummel *et al.*, 2007b; Wells, 2011; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011; Tarahomjoo, 2012).

II.2.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas

De la misma manera que las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés en el sector alimentario (Billman-Jacobe, 1996; Hugenholtz *et al.*, 2002), es posible modificar, mediante ingeniería genética, determinadas rutas metabólicas de las mismas para la producción a gran escala de sustancias nutraceuticas (componentes de los alimentos que poseen efectos beneficiosos para la salud del consumidor), tales como: (i) vitaminas del grupo B (*e.g.*, riboflavina, folatos y cobalamina); (ii) edulcorantes bajos en calorías (*e.g.*, L-alanina, manitol, sorbitol y tagatosa); (iii) oligosacáridos; (iv) exopolisacáridos (EPS); (v) antioxidantes (*e.g.*, glutatión y tioredoxina), y (vi) enzimas (por ej.; β -galactosidasa) (Hugenholtz *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Morello *et al.*, 2008; Maischberger *et al.*, 2010).

II.2.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y ENFERMEDAD

Los consumidores perciben las bacterias lácticas como algo “natural” y beneficioso para la salud, por lo que su presencia en los alimentos tiene gran aceptabilidad. Dado que se aíslan frecuentemente del tracto gastrointestinal de personas sanas, la mayoría de los microorganismos de este grupo se consideran comensales. Por todo ello, se ha aceptado la seguridad e inocuidad para el consumo humano de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos y, en la actualidad, se consideran, generalmente, microorganismos seguros (GRAS y/o QPS) (Adams y Marteau, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Stiles, 1996). No obstante, también se ha relacionado a las bacterias lácticas con el desarrollo de infecciones humanas (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994), si bien estos microorganismos son una causa relativamente rara de las mismas.

Entre las infecciones producidas por bacterias lácticas se encuentran tanto infecciones locales como sistémicas, como, por ejemplo, endocarditis infecciosa, septicemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de la cavidad torácica, infecciones del tracto digestivo y meningitis. La mayoría de las bacterias lácticas asociadas a casos clínicos pertenecen a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, aunque, en ocasiones, se han descrito infecciones causadas por *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* (sección II.4.4), *Lc. lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Pediococcus acidilactici* y *Leuconostoc* spp. (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994; Bessis *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2005; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Salminen *et al.*, 2006; Claesson *et al.*, 2007; Mofredj *et al.*, 2007;

Švec *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Casalta y Montel, 2008; Ogier y Serror, 2008; Ogier *et al.*, 2008; Schirrmeister *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2010; Iwen *et al.*, 2012). A pesar de que en los últimos tiempos existe una preocupación creciente con respecto al incremento del consumo de bacterias lácticas como probióticos en alimentos o complementos alimenticios debido a su posible actuación como agentes causantes de infecciones, es conveniente destacar que: (i) estos microorganismos actúan como patógenos oportunistas, infectando a individuos cuyas defensas están debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, quimioterapia o daño tisular, siendo además su prevalencia menor que la de otros microorganismos patógenos oportunistas, y (ii) los microorganismos implicados en estos procesos no son generalmente de origen alimentario (Adams y Marteau, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Franz *et al.*, 2010). Por último, debe mencionarse que el incremento aparente de los casos de infecciones causadas por bacterias lácticas podría deberse a la combinación de un mejor diagnóstico clínico y al incremento en la supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias (Franz *et al.*, 2010).

II.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: BACTERIOCINAS

II.3.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL

Los péptidos con actividad antimicrobiana se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo producidos por una gran variedad de organismos pertenecientes a los tres dominios (Woese *et al.*, 1990), entre los que se incluyen animales vertebrados e invertebrados (mamíferos, aves, anfibios, peces, crustáceos e insectos), plantas y microorganismos (arqueas, bacterias y hongos) (Hancock *et al.*, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; Diep y Nes, 2002; O'Connor y Shand, 2002; Papagianni, 2003; Cederland *et al.*, 2011; Sperstad *et al.*, 2011; Bakkal *et al.*, 2012; Vilcinskas *et al.*, 2013). Entre las propiedades que los convierten en efectivos péptidos defensivos destacan: (i) su toxicidad selectiva, es decir, su capacidad de distinción entre células productoras y células diana; (ii) su acción antibiótica rápida; (iii) su espectro antibacteriano amplio, y (iv) su baja inducción de resistencias microbianas (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado una gran variedad de péptidos antimicrobianos que, según su mecanismo de biosíntesis, se clasifican en dos grandes grupos: (i) péptidos de síntesis no ribosomal, entre los que se incluyen diversos antibióticos (*e.g.*, polimixinas, bacitracinas y glicopéptidos) producidos por bacterias y hongos, y (ii) péptidos de síntesis ribosomal, producidos por multitud de especies pertenecientes a los tres dominios, Eucarya, Archaea y Bacteria, denominados eucariocinas, archaeocinas y bacteriocinas, respectivamente (Hancock *et al.*, 1995; Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; O'Connor y Shand, 2002; Lüders *et al.*, 2003; Bakkal *et al.*, 2012). La mayoría de los péptidos antimicrobianos de organismos eucariotas superiores son producidos por las mucosas y superficies corporales y, en el caso de los anfibios, se sintetizan en glándulas especiales (Zasloff, 1987; Kreil, 1994). En los mamíferos, estos péptidos se encuentran en los gránulos de los fagocitos (Lehrer *et al.*, 1993; Boman, 1995),

mientras que en los insectos están localizados en la hemolinfa (Boman, 1995), en los que constituyen la primera línea de defensa natural y forman parte de su inmunidad innata.

De forma general, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal muestran una escasa homología en su estructura primaria; sin embargo, tienen en común su pequeño tamaño molecular (aprox., 20–60 aa) y su naturaleza catiónica y anfipática (presencia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas), responsable de su capacidad de interaccionar con las membranas citoplasmáticas de las células sensibles provocando su desestabilización/permeabilización (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Matsuzaki, 1999; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Baltzer y Brown, 2011; Cederlund *et al.*, 2011).

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la acción letal de los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal se basa en la desestabilización de las membranas y su consiguiente despolarización, lo que conduce en última instancia a la muerte celular (Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Baltzer y Brown, 2011), se han descrito péptidos capaces de atravesar las membranas intactas e interaccionar con dianas intracelulares (Nissen-Meyer y Nes 1997; Hancock y Rozek, 2002). A este respecto, se han sugerido como dianas potenciales, además de la membrana, la maquinaria implicada en la división celular, la síntesis de proteínas, ADN o ARN y la activación autolítica, pudiendo actuar cada uno de los péptidos antimicrobianos sobre una o varias de ellas (Hancock y Rozek, 2002; Zasloff, 2002).

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por células eucariotas y bacterias se diferencian en su actividad, espectro de acción y potencia (Tabla II.16). En primer lugar, la actividad de los péptidos antimicrobianos eucarióticos se dirige a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (actividad antimicrobiana) y, también, a células eucariotas (actividad quimiotáctica y proinflamatoria), mientras que, de forma general, los péptidos antimicrobianos bacterianos únicamente tienen una actividad antimicrobiana y un espectro de acción reducido, en el que se incluyen principalmente especies y géneros relacionados. En segundo lugar, los péptidos antimicrobianos bacterianos son activos a concentraciones del orden nano-picomolar, por lo que su potencia es superior a la de los péptidos antimicrobianos eucarióticos, ya que éstos son sólo activos a concentraciones del orden micromolar (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002; Dutton *et al.*, 2002).

La rápida emergencia de poblaciones bacterianas resistentes a numerosos antibióticos en especies con un elevado potencial patogénico ha estimulado el interés por el desarrollo de nuevos compuestos que proporcionen una protección más eficaz frente a las infecciones bacterianas y que puedan ser empleados en las industrias alimentaria y farmacéutica (Bechinger, 1999; Epand y Vogel, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Moll *et al.*, 1999; Pag y Sahl, 2002b; Twomey *et al.*, 2002; Baltzer y Brown, 2011). Entre estos compuestos se encuentran los péptidos antimicrobianos naturales de síntesis ribosomal, particularmente los que ejercen actividad inmunológica, antitumoral, antifúngica y/o antivírica sin resultar hemolíticos ni citotóxicos para las células sanas de vertebrados (Bechinger, 1999). Aunque los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas y procariotas se sintetizan y actúan en condiciones muy diferentes, estos sistemas de defensa natural poseen elementos comunes a nivel molecular, por lo que la caracterización de los de origen eucariótico puede resultar muy relevante en el estudio de los procarióticos, y viceversa, ya

que permitiría optimizar su empleo independiente o conjuntamente en las industrias alimentaria y farmacéutica (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002).

Tabla II.16. Características principales de los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por células procariotas y eucariotas.

	Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por	
	células procariotas	células eucariotas
Características generales	Generalmente de pequeño tamaño molecular (20-60 aa), catiónicos y de carácter anfipático Generalmente actúan permeabilizando la membrana de las células diana	
Actividad	Espectro de acción reducido Generalmente especies y géneros bacterianos estrechamente relacionados filogenéticamente (actividad antimicrobiana)	Espectro de acción amplio Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (actividad antimicrobiana) También células eucariotas (actividad quimiotáctica y proinflamatoria)
Potencia	Muy potentes, alta actividad específica Activos a concentraciones del orden nanomolar	Actividad específica menor Actividad a concentraciones del orden de micromolar

Adaptado de Criado (2006).

II.3.2. BACTERIOCINAS

II.3.2.1. DEFINICIÓN

El concepto de bacteriocina ha evolucionado paulatinamente desde que, durante la primera mitad del siglo XX, diversos investigadores describieron la asociación entre la actividad antimicrobiana de ciertos microorganismos y la producción de sustancias antimicrobianas y propusieron el término “bacteriocina” para englobar a las diferentes sustancias antimicrobianas de origen bacteriano del tipo de las colicinas, caracterizadas por: (i) su adsorción a receptores de membrana específicos; (ii) su actividad intraespecífica restringida a especies filogenéticamente próximas; (iii) su biosíntesis letal; (iv) su naturaleza proteica; (v) su modo de acción bactericida, y (vi) la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad (Jacob *et al.*, 1953). Posteriormente, considerando las diferentes características de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, Tagg *et al.* (1976) las definieron como “sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica activas frente a bacterias con una estrecha relación filogenética con la especie productora”. Esta definición es válida únicamente para algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, ya que otras poseen actividad bactericida frente a microorganismos alejados taxonómicamente de las especies que las producen, por lo que Konisky (1982) propuso una definición más general, definiéndolas como “agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora”. En los últimos años, se ha producido un extraordinario avance en la investigación sobre las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas y, principalmente, de las bacterias lácticas, lo que ha permitido elucidar su

estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, transporte, procesamiento, inmunidad y regulación de su producción. Como consecuencia de todo ello, se han propuesto nuevas definiciones. Así pues, Klaenhammer (1988) las definió como “un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica que varían en su espectro antimicrobiano, modo de acción, tamaño molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas”. Por otra parte, Jack *et al.* (1995) las definieron como “un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas bacterianas de síntesis ribosomal que se secretan al medio extracelular, con o sin modificaciones postraduccionales, y que poseen un espectro de acción antimicrobiano que puede ser reducido y limitado, al menos, a algunas cepas de su misma especie”. Por último, Stiles (1996) definió a las bacteriocinas como “sustancias cuyas únicas características comunes son su carácter proteico y su actividad antimicrobiana”. En definitiva, las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) (Joerger *et al.*, 2000; O’Keeffe y Hill, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Hill y O’Keeffe, 2003; Gálvez *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012).

II.3.2.2. BACTERIOCINAS vs. ANTIBIÓTICOS

Las bacteriocinas y los antibióticos son compuestos antimicrobianos capaces de controlar el crecimiento de determinados microorganismos; no obstante, estas sustancias presentan diferencias en su composición, síntesis, espectro antimicrobiano, modo de acción, mecanismos de inmunidad y/o resistencia y toxicidad (Tabla II.17). Además, resulta importante diferenciar ambos grupos antimicrobianos debido al potencial de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas como bioconservantes alimentarios (sección II.3.3.10.1) y a que, en la mayoría de los países, se lleva a cabo un exhaustivo control de la presencia de antibióticos en los alimentos.

Entre las principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos se incluyen las siguientes (Cleveland *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005):

1. Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal (sección II.3.3.2); mientras que los antibióticos (de naturaleza peptídica o no) son sintetizados únicamente mediante complejos multienzimáticos.
2. Las bacteriocinas son generalmente metabolitos primarios (productos del metabolismo bacteriano generados durante la fase de crecimiento exponencial), cuya producción está regulada frecuentemente por un sistema de regulación de tres componentes (sección II.3.3.7.4); mientras que los antibióticos son metabolitos secundarios (productos del metabolismo bacteriano generados durante la fase estacionaria).
3. El espectro de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas es generalmente reducido, incluyéndose principalmente bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente con el microorganismo productor, excepto en el caso de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, que poseen un espectro de acción amplio (sección II.3.3.3); mientras que los antibióticos tienen un espectro de

actividad mucho más amplio, en el que se incluyen bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y células eucariotas.

4. Cada bacteriocina tiene su propia proteína de inmunidad, cuyo gen está ligado al gen estructural de la bacteriocina (sección II.3.3.7.2); mientras que los determinantes genéticos que codifican la resistencia a antibióticos no están ligados a los genes que codifican su síntesis, por lo que se expresan independientemente.

Tabla II.17. Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos.

	Bacteriocinas	Antibióticos
Composición	Proteica	Variable, en ocasiones proteica
Síntesis	Metabolitos primarios Ribosomal, generalmente como precursores inactivos	Metabolitos secundarios No ribosomal (complejos multi-enzimáticos)
Espectro de actividad antimicrobiana	Variable Generalmente espectro reducido (especies relacionadas filogenéticamente)	Variable Afectan a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y a células eucariotas
Modo de acción	Generalmente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática En ocasiones, inhiben la biosíntesis de la pared bacteriana	Inhiben diversas funciones celulares (e.g., síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN)
Requerimientos para la interacción con la célula diana	En ocasiones, receptores específicos o moléculas <i>docking</i> (que facilitan su interacción con las dianas celulares de las células sensibles)	Receptores específicos
Inmunidad de la célula productora	Codificada por los genes de inmunidad	No descrita
Resistencia/Tolerancia	Generalmente por modificaciones en la composición de la membrana	Genes de resistencia específicos y transferibles, transportadores de resistencia a múltiples fármacos, mutaciones en las dianas celulares
Toxicidad/Efectos colaterales	No descritos	Descritos
Aplicación	Alimentos ^a y clínica	Clínica

^aLa aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios únicamente se ha propuesto para las producidas por las bacterias lácticas, habiéndose autorizado internacionalmente solamente la nisina como aditivo alimentario. *Adaptado de Cleveland et al. (2001) y Nes et al. (2002).*

II.3.2.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

La capacidad de producir bacteriocinas (bacteriocinogenicidad) es un rasgo fenotípico muy extendido entre las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas; no obstante, las bacteriocinas producidas por ambos grupos de microorganismos poseen distintas características, destacando las diferencias en su

tamaño molecular, estructura, espectro y modo de acción, organización genética y mecanismos de secreción, inmunidad y regulación de su producción (Tabla II.18).

II.3.2.3.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (Tabla II.18) constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su tamaño molecular, dianas microbianas, modo de acción y mecanismos de inmunidad (Riley y Wertz, 2002). Dentro de este grupo, las bacteriocinas producidas por la familia *Enterobacteriaceae* son las mejor caracterizadas y se han clasificado en dos grupos principales: (i) grupo de las colicinas, que constituye el prototipo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, y (ii) grupo de las microcinas (Pons *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Por otra parte, las piocinas constituyen el grupo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Finalmente, existe otro grupo de bacteriocinas, que no están totalmente caracterizadas, entre las que se encuentran la carotovoricina, serracina P y glicinicina A, producidas por *Erwinia carotovora* subesp. *carotovora*, *Serratia phymithicum* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente, que son activas frente a microorganismos patógenos de las plantas y que están codificadas en plásmidos o cromosomas (Fett y Maher, 1985; Heu *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001; Jabrane *et al.*, 2002; Holtsmark *et al.*, 2008).

Las colicinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* y caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente grande (25–80 kDa); (ii) la estimulación de su producción por condiciones de estrés que inducen la respuesta SOS (*e.g.*, niveles reducidos de oxígeno y nutrientes); (iii) su síntesis generalmente letal para la célula productora; (iv) su interacción con las células diana a través de receptores específicos de la superficie celular, lo que determina la especificidad en el reconocimiento de la célula diana; (v) su estructura en dominios, con un dominio N-terminal (implicado en la translocación de la bacteriocina al interior de la célula diana), un dominio central (implicado en la interacción con el receptor) y un dominio C-terminal (implicado en la lisis celular y la inmunidad); (vi) la localización plasmídica de las agrupaciones génicas que codifican su producción e inmunidad, y (vii) su actividad frente a cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. (Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005; Cascales *et al.*, 2007). Entre los genes necesarios para la producción de las colicinas se incluyen los siguientes: (i) gen estructural, que codifica la bacteriocina; (ii) gen de inmunidad, que codifica una proteína que confiere inmunidad a la célula productora mediante su unión a la colicina y la posterior inactivación de ésta, y (iii) gen de lisis, que codifica una proteína implicada en la liberación de la colicina mediante la lisis de la célula productora. Según su modo de acción, las colicinas se clasifican en dos subgrupos: (i) colicinas con actividad formadora de poros en la membrana bacteriana, cuya longitud varía entre 449 y 629 aminoácidos, y (ii) colicinas con actividad nucleasa sobre ADN, ARNr y ARNt, que incluye moléculas cuya longitud varía entre 178 y 777 aminoácidos (Joerger *et al.*, 2000; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005; Cascales *et al.*, 2007).

Por otra parte, las microcinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* (excepto una producida por *Klebsiella pneumoniae*) caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente pequeño (<10 kDa);

(ii) su producción no inducida por el sistema SOS; (iii) su síntesis no letal para la célula productora; (iv) su secreción generalmente durante la fase de crecimiento exponencial; (v) su modo de acción mediante la formación de poros en la membrana celular o mediante la desestabilización del potencial de membrana, y (vi) un espectro de acción frente a enterobacterias más amplio que el de las colicinas. Las microcinas se agrupan en dos clases (I y II) según la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente. La clase I (microcinas B17, C7, J25 y D93) agrupa las microcinas de tamaño molecular <5 kDa, con modificaciones postraduccionales y que ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002). Por otra parte, la clase II agrupa a las microcinas de mayor tamaño molecular (7–10 kDa), y a su vez se subdivide en 2 subclases: subclase IIa y subclase IIb. Las microcinas de la subclase IIa se caracterizan por la ausencia de modificaciones postraduccionales, la posible presencia de puentes disulfuro y su actividad sobre la membrana citoplasmática (microcinas L, ColIV y 24), mientras que la subclase IIb incluye microcinas lineales que sufren una modificación postraducciona en el extremo C-terminal por la unión covalente de un grupo catecol sideróforo de tipo salmocelin (microcinas E492, H47, I47 y M) (Duquesne *et al.*, 2007a; Azpiroz *et al.*, 2009; Budič *et al.*, 2011). Estudios recientes sugieren que existe una relación entre la capacidad de las cepas de *E. coli* de producir microcinas de la subclase IIb y su virulencia en el tracto urogenital (Azpiroz *et al.*, 2009; Budič *et al.*, 2011); sin embargo, las microcinas de la subclase IIa comparten muchas propiedades con las bacteriocinas de la clase IIa producidas por las bacterias lácticas (sección II.3.3.2), entre las que destacan: (i) su pequeño tamaño molecular; (ii) su termorresistencia; (iii) su hidrofobicidad; (iv) su síntesis como precursores inactivos (prebacteriocina); (v) la presencia de extensiones N-terminales del tipo secuencia líder; (vi) su secreción mediante transportadores del tipo ABC (del inglés, *ATP Binding Cassette*); (vii) la ausencia de modificaciones postraduccionales, y (viii) su actividad a nivel de membrana (Pons *et al.*, 2002).

Finalmente, las piocinas son bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* caracterizadas por los siguientes aspectos: (i) las agrupaciones génicas que codifican su producción se encuentran en el cromosoma y están constituidas por un gen estructural, un gen de inmunidad y, en algunos casos, un gen de lisis; (ii) su expresión está inducida por agentes mutagénicos (*e.g.*, radiación ultravioleta o mitomicina C) que inducen la respuesta SOS, y (iii) su espectro de acción está limitado a cepas de *Ps. aeruginosa* y otras bacterias Gram-negativas (*e.g.*, *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp.) (Duport *et al.*, 1995; Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Según su estructura, las piocinas se agrupan en tres tipos (R, F y S): (i) las piocinas del tipo R son cilindros huecos que actúan desestabilizando el potencial de membrana de la célula sensible (Kageyama, 1964); (ii) las piocinas del tipo F son “varas” no contráctiles con una estructura cuadrada en un extremo y una estructura fibrilar en el otro extremo (Kuroda y Kagiya, 1983), y (iii) las piocinas del tipo S son más pequeñas (similares a las colicinas), solubles, sensibles a las proteasas y con un modo de acción consistente en la formación de poros o en su actividad nucleasa frente al ADN y ARN (Duport *et al.*, 1995; Parret y de Mot, 2000; Michel-Briand y Baysse, 2002).

II.3.2.3.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas son tan abundantes como las producidas por bacterias Gram-negativas, pero constituyen un grupo mucho más heterogéneo (Riley y Wertz, 2002). Entre las características diferenciales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas se incluyen las siguientes (Tabla II.18): (i) su síntesis no es letal para la célula productora, ya que el transporte está mediado generalmente por sistemas de transporte específicos y, ocasionalmente, por el sistema Sec (también denominado Ruta General de Secreción) (sección II.3.3.7.3.2); (ii) su síntesis está mediada generalmente por sistemas de regulación específicos para cada bacteriocina; (iii) su producción está asociada generalmente al final de la fase de crecimiento exponencial y el comienzo de la fase estacionaria, y (iv) su espectro de acción antimicrobiana es variable, pero generalmente está restringido a otras bacterias Gram-positivas (Riley y Wertz, 2002). De forma general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas se agrupan en tres clases principales: (i) clase I (lantibióticos), en la que se incluyen las subclases Ia (lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos) y Ib (lantibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrofóbicos); (ii) clase II (no lantibióticos), en la que se incluyen las subclases IIa (bacteriocinas del tipo pediocina o *pediocin-like*), IIb (sistemas de dos péptidos), IIc (bacteriocinas sin secuencia líder), IId (bacteriocinas de estructura cíclica) y IIE (otras bacteriocinas no incluidas en las subclases anteriores), y (iii) clase III, donde se incluyen las bacteriocinas de elevado tamaño molecular (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nes *et al.*, 2007). El heterogéneo grupo de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, cuyas características principales se describen en la siguiente sección, constituye el prototipo de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas

II.3.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de síntesis ribosomal que varían en sus propiedades físico-químicas, espectro de acción antimicrobiana, modo de acción, mecanismos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción y en la organización molecular de los determinantes genéticos implicados en estos procesos (Cintas *et al.*, 2000b; Martínez *et al.*, 2000c, d; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nishie *et al.*, 2012; Nes *et al.*, 2012). Durante los últimos años, debido a la posible aplicación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en la bioconservación de los alimentos o como agentes terapéuticos, se ha producido un extraordinario avance en su investigación, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación (Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Oscáriz y Pisabarro, 2001; Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2010; Bakkal *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Tabla II.18. Características principales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

	Gram-negativas^a	Gram-positivas
Tamaño molecular	Generalmente elevado (proteínas) Variable según el modo de acción (5-80 kDa)	Generalmente pequeño (péptidos) Variable (2-35 kDa)
Espectro de actividad	Estrecho, generalmente reducido a especies estrechamente relacionadas filogenéticamente	Generalmente restringido a bacterias Gram-positivas Variable: reducido (<i>e.g.</i> , lactocinas A, B y M) o amplio (<i>e.g.</i> , nisina y pediocina PA-1)
Producción	Letal para la célula productora Regulada por genes de regulación de la célula productora (inducida por condiciones que inducen la respuesta SOS)	No letal para la célula productora Ocasionalmente regulada por sistemas de regulación específicos para cada Principalmente entre la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria
Organización genética	Gen estructural Gen de inmunidad Gen de lisis celular	Gen(es) estructural(es) Gen(es) de modificaciones postraduccionales Gen de procesamiento Gen(es) de secreción Gen(es) de inmunidad Genes de regulación
Localización de los genes	Generalmente en plásmidos	Plásmidos, cromosoma y transposones
Transporte	Generalmente a través de la lisis celular Ocasionalmente a través de transportadores del tipo ABC (del inglés <i>ATP-Binding Cassette</i>)	Generalmente a través de transportadores del tipo ABC Ocasionalmente mediante el sistema Sec
Presencia de dominios	Dominio N-terminal (translocación) Dominio central (unión al receptor) Dominio C-terminal (lisis e inmunidad)	Dominio N-terminal (unión a la membrana) Dominio C-terminal (inserción en la
Modo de acción	Formación de poros en las membranas celulares Actividad nucleasa frente a ADN, ARNr y ARNt	Generalmente a través de la formación de poros en las membranas celulares
Clasificación	Colicinas (25-80 kDa): subgrupo de colicinas formadoras de poros y colicinas con actividad nucleasa Microcinas (<10 kDa): clases I (<5 kDa) y II (7-10 kDa) Piocinas: tipos R, F y S Bacteriocinas activas frente a patógenos de las plantas: caratovoricina, serracina P y glicinicina	Clase I (lantibióticos) (<5 kDa): subclases A y B Clase II (no lantibióticos) (<10 kDa): subclases IIa, IIb, IIc, IId y IIe Clase III (>30 kDa)

^aLas características se refieren al grupo de las colicinas (prototipo de las bacteriocinas producidas por Gram-negativas). Adaptado de Criado (2006).

II.3.3.1. CLASIFICACIÓN

A pesar de su heterogeneidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en alguna de las tres clases principales descritas para las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas (Tabla II.18) (sección II.3.2.3.2) (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nishie *et al.*, 2012):

1. Clase I (lantibióticos). Bacteriocinas policíclicas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos poco usuales resultantes de modificaciones postraduccionales (Sahl y Bierbaum, 1998; Guder *et al.*, 2000; Pag y Sahl, 2002a; Twomey *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005; Dufour *et al.*, 2007; Alkhatib *et al.*, 2012; Knerr y van der Donk, 2012). Las modificaciones postraduccionales más comunes son: (i) la deshidratación de residuos de serina (Ser) y treonina (Tre), que origina deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb), respectivamente, y (ii) la condensación de residuos Dha y Dhb con grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína (Cys) cercanos, lo que origina lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan), respectivamente. El prototipo de esta clase es la nisina A (NisA), que, además, es la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario en determinados alimentos (sección II.3.3.10.1.1) (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Davies y Delves-Broughton, 2000; Cheigh y Pyun, 2005). En función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen, a su vez, en dos grupos:
 - a. Tipo Ia. Lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos que actúan a nivel de membrana plasmática formando poros. Este grupo se subdivide en: (i) subgrupo Ia1, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo FNLDV (sección II.3.3.7.1), es procesada por una serín-proteasa (*e.g.*, NisA y nisina Z [NisZ]), y (ii) subgrupo Ia2, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo “doble glicina” (sección II.3.3.7.1), es procesada por un transportador del tipo ABC, como es el caso de Ltn481 y de todos los sistemas de dos péptidos (*e.g.*, citolisina [Cyl]), cuya actividad total depende de la acción complementaria de dos péptidos con actividad antimicrobiana débil de manera individual, pero potente cuando actúan conjuntamente (Nagao *et al.*, 2006; Lawton *et al.*, 2007; Smith y Hillman, 2008).
 - b. Tipo Ib. Lantibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrófobos, inmunológicamente activos, que actúan como inhibidores de enzimas (*e.g.*, mersacidina, cinamicina, actagardina y duramicinas B y C). Conviene destacar que, hasta la fecha, no se ha descrito ningún lantibiótico de este tipo producido por bacterias lácticas (Skaugen *et al.*, 2003).
2. Clase II (no lantibióticos). Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, con un punto isoelectrico elevado (pI 8–11), sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática (Nes y Holo, 2000; Nes *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2011). Tradicionalmente las bacteriocinas de la clase II se han subdividido en tres grupos:

- a. Subclase IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina). Bacteriocinas con una potente actividad anti-*Listeria* y con un elevado grado de homología estructural (40–60%), especialmente en la región N-terminal, en la que se incluye la secuencia consenso conservada YGNGVXCX₄CXV (donde X representa un residuo aminoacídico no conservado) que incluye dos residuos Cys que forman un puente disulfuro esencial para la actividad antimicrobiana (e.g., sakacina P [SakP]) (Ennahar *et al.*, 1999, 2000; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2012). El espectro de acción de las bacteriocinas de esta subclase es muy amplio e incluye generalmente tanto a otras bacterias lácticas como a microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.). El prototipo de este grupo es la pediocina PA-1 (PedPA-1) (Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), que es la bacteriocina de las bacterias lácticas mejor caracterizada después de NisA.
 - b. Subclase IIb (sistemas de dos péptidos). Bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos (Cintas *et al.*, 1998a; Garneau *et al.*, 2002; Oppegård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010). Estos sistemas se clasifican, a su vez, en dos tipos: (i) sistemas en los que los dos péptidos no poseen actividad antimicrobiana independiente, por lo que es necesaria su presencia simultánea para que la bacteriocina sea activa (e.g., lactococcina G [α y β]), y (ii) sistemas en los que uno o ambos péptidos son activos independientemente, pero cuya actividad aumenta notablemente en presencia del otro péptido (e.g., lactacina F [A y B] y enterocina L50 [L50A y L50B], respectivamente).
 - c. Subclase IIc. Bacteriocinas de la clase II que no se incluyen en ninguna de las subclases anteriores (e.g., carnobacteriocina A [CbnA], enterocina B [EntB] y enterocina Q [EntQ]).
3. Clase III. Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles (inactivadas con tratamientos térmicos a 60–100°C durante 10–15 min) (e.g., helveticina J y enterolisina A [EnlA]).

Conviene destacar que Klaenhammer (1993) propuso la existencia de una cuarta clase, compuesta por bacteriocinas complejas e integradas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica. No obstante, antes de reconocer a esta clase como independiente, debe completarse la caracterización bioquímica de todas las bacteriocinas inicialmente adscritas a la misma, purificándolas a homogeneidad, ya que en algunos casos, tras su purificación se demostró que su naturaleza era exclusivamente peptídica (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995). Por otra parte, Kemperman *et al.* (2003) sugirieron la existencia de una nueva clase constituida por bacteriocinas con una estructura cíclica resultante de la formación de un enlace peptídico entre las regiones N- y C-terminal de la molécula y que no presentan aminoácidos modificados postraduccionalmente (e.g., circularina A [CirA], EntAS-48, gassericina A [GasA] y reutericina 6) (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004, 2008); no obstante, en dos revisiones recientes estas bacteriocinas se han incluido como una subclase de la clase II (Cotter *et al.*, 2005b; Nes *et al.*, 2007). Asimismo, Cotter *et al.* (2005b) designaron a todos los compuestos termolábiles y de elevado tamaño molecular, tradicionalmente agrupados en la clase III, como bacteriolisinas (hidrolasas de la mureína), excluyéndolos así del grupo de las

bacteriocinas, ya que difieren de las bacteriocinas tradicionales en: (i) su mecanismo de acción, ya que provocan la lisis celular mediante la hidrólisis de la pared bacteriana; (ii) su estructura modular, compuesta por un dominio N-terminal catalítico con homología con endopeptidasas y un dominio C-terminal implicado en el reconocimiento de su diana celular, y (iii) la posible ausencia de gen(es) de inmunidad en sus operones, ya que la inmunidad de la célula productora puede depender de modificaciones en su pared bacteriana. Por otra parte, Nes *et al.* (2007) clasificaron a las bacteriocinas en dos grandes grupos (clase I, lantibióticos y clase II, no lantibióticos) y a su vez, las pertenecientes a la clase II las subdividieron en cuatro subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos); (iii) IIc (bacteriocinas sin extensión N-terminal), y (iv) IId (bacteriocinas con estructura cíclica). No obstante, de Vuyst y Leroy (2007) agruparon a las bacteriocinas de la clase II en sólo tres subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos), y (iii) IIc (bacteriocinas con estructura cíclica); sin embargo van Belkum y Stiles (2000) propusieron una subdivisión de la clase II en seis subclases. Recientemente, Zouhir *et al.* (2010) propusieron una clasificación basada en una nueva caracterización de las secuencias según su estructura, lo cual permite agrupar las bacteriocinas en 12 grupos. Por último, Cui *et al.* (2012) propusieron clasificar a las bacteriocinas de la clase IIa en ocho subgrupos en función de su secuencia consenso conservada, su estructura 3D y su mecanismo de acción. De todo lo descrito anteriormente, se desprende la existencia de numerosas discrepancias a la hora de clasificar las bacteriocinas, lo que es debido tanto a la diversidad bioquímica de las mismas como a los criterios seleccionados para su clasificación, por lo que es una tarea que todavía no se ha resuelto de forma unánime y satisfactoria. Por todo ello, en este trabajo se propone una clasificación de las bacteriocinas basada en las propuestas por Diep y Nes (2002) y Nes *et al.* (2007) (Tabla II.19).

II.3.3.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son de naturaleza peptídica y, por lo tanto, se inactivan presumiblemente por la acción de enzimas proteolíticas de origen gástrico (pepsina) y/o pancreático (tripsina y quimiotripsina) (Gänzle *et al.*, 1999; Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b). Esta propiedad es interesante desde el punto de vista de la seguridad de estos compuestos, ya que, en el caso de emplearse como bioconservantes en la industria alimentaria, la ecología microbiana del tracto digestivo de los consumidores no resultaría afectada (Piard y Desmazeaud, 1991; Bernbom *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010).

En lo que respecta a su composición aminoacídica, los lantibióticos (clase I) constituyen una clase especial de bacteriocinas policíclicas caracterizadas por la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente (Dha, Dhb, Lan y MeLan). Por otra parte, las bacteriocinas de las clases II y III carecen de modificaciones postraduccionales, con la excepción de la formación de una estructura cíclica en EntAS-48 (bacteriocina Bac21) (Martínez-Bueno *et al.*, 1994), CirA (Kemperman *et al.*, 2003), GasA (Kawai *et al.*, 2004) y reutericina 6 (Kawai *et al.*, 2004), y del establecimiento de puentes disulfuro entre los residuos Cys (2–4 Cys: 1–2 puentes disulfuro) de las bacteriocinas de la clase IIa (Casaus, 1998;

Eijsink *et al.*, 1998). A este respecto, Klaenhammer (1993) clasificó las bacteriocinas en tres grupos en función de su contenido en residuos Cys: (i) cistibióticos o bacteriocinas con uno o más puentes disulfuro (*e.g.*, PedPA-1/pediocina AcH [PedAcH] y EntP); (ii) tiolbóticos o bacteriocinas con un único residuo de Cys (*e.g.*, LciB), y (iii) bacteriocinas que carecen de residuos Cys (*e.g.*, LciA, LciM y LciG).

Tabla II.19. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.

Clase	Características generales	Subclase ^a	Características particulares	Ejemplos
I	Lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<5kDa) con aminoácidos modificados postraduccionamente (Dha, Dhb, Lan y MeLan)	Ia1	Péptidos elongados y flexibles procesados por una serín-proteasa	Lactocina S Nisinas A y Z
		Ia2	Péptidos elongados y flexibles procesados por un transportador del tipo ABC Sistema de dos péptidos	Lacticina 481 Lactococcina S Plantaricina C Lacticina 3147 (A1 y A2) Plantaricina W (α y β) Citolisina (L _L y L _S)
II	No lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables y con una potente actividad anti- <i>Listeria</i>	IIa	Secuencia consenso N-terminal YGNGVXCX ₄ CXV ^b	Pediocina PA-1/AcH Sakacinas A y P Enterocinas A y P
		IIb	Sistemas de dos péptidos	Sakacina T (T _{α} y T _{β}) Lactacina F (A y B) Plantaricinas EF y JK Enterocina L50 (L50A y L50B)
		IIc	Sin extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal)	Enterocinas L50 (L50A y L50B), Q y EJ97
		IId	Estructura cíclica	Gassericina A Enterocina AS-48
		IIE	Otros péptidos de la clase II	Carnobacteriocina A Enterocina B Lactococcina A Sakacina Q
III	Proteínas termosensibles de elevado tamaño molecular (>30 kDa)	-	-	Helveticina J Lactacina A Enterolisina A

^aHasta la fecha no se ha descrito ningún lantibiótico del subgrupo Ib producido por bacterias lácticas. ^bX representa un residuo aminoacídico no conservado. Adaptado de Diep y Nes (2002) y Nes *et al.* (2007).

Con respecto al tamaño molecular, los lantibióticos son péptidos pequeños que contienen 19–37 aminoácidos (1,9–4,6 kDa), las bacteriocinas de la clase II poseen 37–59 residuos aminoacídicos y una masa molecular inferior a 10 kDa y, por último, las bacteriocinas de la clase III presentan una masa

molecular considerablemente superior a la de las anteriores (>30 kDa) (Cintas *et al.*, 2000b). La mayoría de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) son catiónicas a pH 7,0 (Jack *et al.*, 1995), poseen un elevado punto isoeléctrico y contienen regiones hidrofóbicas y/o hidrofílicas en sus moléculas, lo que se correlaciona con su actividad sobre la membrana citoplasmática ya que: (i) su elevado pI les permite unirse a los fosfolípidos de carga neta negativa presentes en la membrana de las células sensibles, y, por otra parte, (ii) su naturaleza antipática les permite su distribución a lo largo de la membrana (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999; Diep y Nes, 2002). Además, estas bacteriocinas son generalmente activas a pH ácido y neutro, lo que podría reflejar su adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan los microorganismos productores (Piard y Desmazeaud, 1991; Cintas, 1995). En general, estas bacteriocinas resisten la exposición a un amplio intervalo de valores de pH (3,0–9,0) (Cintas, 1995), habiéndose descrito la tolerancia a valores de pH más extremos (entre 1,0–2,0 y 10,0–11,0) de la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994) y la bavaricina A (BavA) (Larsen y Nørrung, 1993). Por el contrario, existen bacteriocinas que presentan un intervalo de pH óptimo para su actividad muy estrecho, así, por ejemplo, la solubilidad de NisA disminuye considerablemente en el intervalo de pH 2,0–6,0 y se inactiva irreversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981).

Otra característica común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es su termoestabilidad, que depende de diversos factores como, entre otros, el grado de pureza de la bacteriocina y el pH del medio (Cintas *et al.*, 2001). En este contexto, las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células (bacteriocinas no purificadas) resisten el calentamiento a 100–121°C y el autoclavado, a excepción de las bacteriocinas de la clase III (*e.g.*, helveticina J) y de la bacteriocina de la clase II enterocina 01 (Olasupo *et al.*, 1994). No obstante, la estabilidad térmica de las bacteriocinas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad disminuye considerablemente (Cintas *et al.*, 2001).

II.3.3.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

En condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas. No obstante, la amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y del estado de las células diana, pudiendo fluctuar entre un espectro muy reducido, limitado a cepas con una estrecha relación filogenética con la cepa productora (*e.g.*, LciA), y un espectro relativamente amplio, que incluye microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos como *Listeria monocytogenes*, *St. aureus*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* (*e.g.*, enterocina L50 [L50A y L50B], NisA y PedPA-1). Además, las concentraciones inhibitoras mínimas para las células vegetativas y las esporas varían ostensiblemente dependiendo de la cepa productora, el tipo de muestra y las condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana (Blom *et al.*, 1997).

En general, pueden realizarse las siguientes observaciones con respecto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) (Jack *et al.*, 1995): (i) dentro de una misma especie pueden existir cepas sensibles y resistentes a una bacteriocina determinada; (ii) dentro de una población de células sensibles a una bacteriocina pueden existir células resistentes; (iii) una cepa

sensible a una bacteriocina puede ser resistente a otra bacteriocina similar; (iv) las cepas productoras de bacteriocina(s) pueden ser sensibles a otras bacteriocinas, incluso similares a la que producen; (v) las células vegetativas de una cepa cuyos esporos bacterianos sean resistentes a una bacteriocina pueden ser sensibles a esa misma bacteriocina, y (vi) en condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas no son activas frente a las bacterias Gram-negativas, a excepción de ciertas bacteriocinas (Lauková *et al.*, 1993; Simonetta *et al.*, 1997; Jennes *et al.*, 2000; Kang y Lee, 2005; Todorov *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2005a; Yoon *et al.*, 2005; de Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Martín-Platero *et al.*, 2006; Sparo *et al.*, 2006; Line *et al.*, 2008; Svetoch *et al.*, 2008a, 2011; Messaoudi *et al.*, 2012; de la Fuente-Salcido *et al.*, 2012), entre las que destaca EntAS-48 que es activa frente a *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Gálvez *et al.*, 1989), ni frente a virus, con algunas excepciones (sección II.3.4.10.2). A este respecto, la estructura y composición de las membranas de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impiden el acceso de las bacteriocinas a su lugar de actuación (membrana citoplasmática). No obstante, a pesar de que, generalmente, estos microorganismos no resultan afectados por las bacteriocinas de las bacterias lácticas en condiciones fisiológicas, éstos pueden sensibilizarse mediante tratamientos subletales que alteran la permeabilidad de su pared celular, entre los que se incluyen la exposición a diversos agentes químicos (*e.g.*, ácidos orgánicos y EDTA) y condiciones ambientales estresantes (*e.g.*, pH, congelación, tratamiento térmico suave y presión hidrostática elevada) (Kalchayanand *et al.*, 1992; Helander *et al.*, 1997; Kalchayanand *et al.*, 1998; Garriga *et al.*, 2000; de Vuyst y Leroy, 2007).

En función de su espectro de acción antimicrobiana, Jack *et al.* (1995) clasificaron las bacteriocinas en tres grupos: (i) bacteriocinas con espectro de acción reducido, únicamente activas frente a cepas de la misma especie que la del microorganismo productor (*e.g.*, LciA) o a otras especies de su mismo género (*e.g.*, amilovorina L471); (ii) bacteriocinas con espectro de acción intermedio, que inhiben, además, a otros géneros de bacterias lácticas distintos al del microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. y/o *Clostridium* spp. (*e.g.*, Ltn481 y plantaricinas S [PltS] y T [PltT]), y (iii) bacteriocinas con un amplio espectro de acción, activas frente a un gran número de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen, además de las mencionadas anteriormente, especies de los géneros *Bacillus*, *Brochothrix* y/o *Propionibacterium*. Dentro de este grupo se incluyen la enterocina L50 (L50A y L50B) (EntL50 [EntL50A y EntL50B]), leucocina S (LeuS), PedPA-1, NisA y NisZ, que inhiben también la germinación de los esporos de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. Por otra parte, conviene destacar que existe una fuerte correlación positiva entre la amplitud del espectro de acción antimicrobiana y la presencia de un enlace disulfuro extra en las bacteriocinas de la clase IIa (Eijssink *et al.*, 1998; Nes y Holo, 2000; Richard *et al.*, 2006; Rihakova *et al.*, 2009).

II.3.3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son generalmente metabolitos primarios (de Vuyst *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996; Parente *et al.*, 1997; Krier *et al.*, 1998; Lejeune *et al.*, 1998; Leroy y de Vuyst, 1999; Aymerich *et al.*, 2000b; Messens *et al.*, 2003), por lo que, en principio, puede lograrse una mejora de su producción mediante la optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo

productor, lo que incluye diversos factores relacionados con la composición del medio (*e.g.*, fuente de carbohidratos y nitrógeno) y con las condiciones de fermentación (*e.g.*, pH, temperatura, tiempo de incubación, aireación, agitación y tamaño del inóculo) (Lejeune *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999; Leroy y de Vuyst, 2002; Leroy *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007; Nes *et al.*, 2007; Altuntas *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). No obstante, en ciertas ocasiones, pequeñas diferencias de crecimiento debidas a modificaciones en las condiciones ambientales (pH, temperatura y concentración de glucosa) provocan variaciones considerables en la producción de algunas bacteriocinas (Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999). Por otra parte, debido a las complejas interacciones que tienen lugar entre los múltiples factores que afectan a la producción de las bacteriocinas y/o a su inactivación, en ocasiones, las condiciones óptimas para el crecimiento de una cepa bacteriocinogénica difieren de las óptimas para la producción de su(s) bacteriocina(s) (de Vuyst *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Parente y Ricciardi, 1999; Aasen *et al.*, 2000; Mørretro *et al.*, 2000; Leroy y de Vuyst, 2002, 2005; Zamfir y Grosu-Tudor, 2009). En este sentido, las condiciones de estrés ambiental, a pesar de provocar una reducción en la tasa de crecimiento del microorganismo, pueden estimular la producción de bacteriocinas (de Vuyst *et al.*, 1996; Uguen *et al.*, 1999; Neysens *et al.*, 2003; van den Berghe *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2001a), ya que se ha observado frecuentemente que: (i) el pH óptimo para la producción de bacteriocinas es ligeramente inferior al óptimo para el crecimiento del microorganismo productor (Krier *et al.*, 1998), y (ii) el estrés térmico y el cultivo del microorganismo a temperaturas subóptimas de crecimiento pueden provocar un incremento en el rendimiento de la producción de bacteriocinas (Lejeune *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999). Asimismo, se ha descrito la producción regulada de algunas bacteriocinas por sistemas de regulación de tres componentes o de transducción de señal (sección II.3.3.7.4), por lo que, entre otros factores, las condiciones de cultivo (*e.g.*, pH) podrían actuar a través de este mecanismo controlando su producción (Herranz, 2001).

II.3.3.5. PURIFICACIÓN

Debido al potencial empleo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes de los alimentos en forma de aditivos (sección II.3.3.10.1.1), se han desarrollado diversos protocolos de purificación con el fin de mejorar los rendimientos obtenidos (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Casaus *et al.*, 1997; Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra *et al.*, 2004; Beaulieu *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007); no obstante, antes de proceder a la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas, es recomendable optimizar su producción (sección II.3.3.4), lo que, si es posible, se debería realizar empleando fermentadores para garantizar que los parámetros claves se mantengan estables durante el tiempo de incubación (Parente y Ricciardi, 1999). En cualquier caso, dado que las bacteriocinas son péptidos que se secretan al medio extracelular, la mayoría de los protocolos de purificación se inician con una etapa de concentración de las sustancias de naturaleza proteica presentes en los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de los cultivos de los microorganismos productores, con el objetivo de reducir el volumen de la muestra. Esta etapa inicial de concentración puede realizarse mediante: (i) precipitación de las proteínas con sales (*e.g.*, sulfato amónico) o con ácidos (*e.g.*, ácido siálico); (ii) extracción de las proteínas con solventes orgánicos (*e.g.*, etanol y butanol); (iii)

adsorción dependiente del pH de las bacteriocinas a los restos de las células productoras resultantes del tratamiento térmico y a otros sustratos; (iv) filtración por diálisis o ultrafiltración; (v) desecación al vacío, o (vi) liofilización (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 1997; Parente y Ricciardi, 1999; Cintas *et al.*, 2001; Ananou *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2012). A continuación, el empleo de diversas técnicas seleccionadas con base en las propiedades físico-químicas de las bacteriocinas, permite su separación del resto de compuestos proteicos y, por lo tanto, su purificación a homogeneidad. Hasta la fecha, se han descrito numerosas técnicas de purificación que, generalmente, incluyen diversas etapas cromatográficas (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Carolissen-MacKay *et al.*, 1997; Parente y Ricciardi, 1999; Guyonnet *et al.*, 2000; Uteng *et al.*, 2003; Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra *et al.*, 2004; Beaulieu *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007), si bien, en algunas ocasiones, las etapas cromatográficas han sido sustituidas por etapas de enfoque isoeléctrico (Venema *et al.*, 1997).

Hasta la fecha, el protocolo de purificación de bacteriocinas que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en el pequeño tamaño molecular, la naturaleza catiónica y la relativa hidrofobicidad de estos compuestos (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Este protocolo incluye: (i) el desarrollo de la cepa bacteriocinogénica en un medio líquido bajo condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas; (ii) la obtención del correspondiente sobrenadante libre de células; (iii) la precipitación de las proteínas mediante adición de sulfato amónico y, por último, (iv) diversas etapas cromatográficas, entre las que incluyen cromatografías de intercambio iónico (aniónico o catiónico), interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*). A este respecto, algunos autores han descrito una variante de este protocolo que incluye una etapa cromatográfica de filtración en geles previa al intercambio catiónico (Cintas, 1995; Casaus *et al.*, 1997). Alternativamente, se han desarrollado métodos basados en la capacidad de ciertas bacteriocinas de adsorberse a las membranas externas de las células productoras y, en general, a células de bacterias Gram-positivas inactivadas por calor (Yang *et al.*, 1992). A este respecto, esta metodología implica el ajuste del pH de los cultivos al valor en el que se produzca la máxima adsorción de moléculas de bacteriocina, lo que suele ocurrir a un pH alrededor de 6. Así pues, este protocolo incluye: (i) el crecimiento de la cepa productora en un medio líquido bajo condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas; (ii) la pasteurización del cultivo para destruir las células y el ajuste de su pH a 6; (iii) la centrifugación del cultivo; (iv) la resuspensión de las células en tampón salino a pH 2; (v) la incubación de la suspensión celular a 4°C, y (vi) su posterior diálisis, concentración por liofilización y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Asimismo, Venema *et al.* (1997) desarrollaron un protocolo para la purificación de PedPA-1, que incluye sólo tres pasos: (i) precipitación de las proteínas de los sobrenadantes libres de células mediante adición de etanol preenfriado; (ii) isoelectroenfoque, y (iii) ultrafiltración. Aunque este método evita el empleo de técnicas cromatográficas, la eficacia del proceso no resulta mejorada.

Tras la purificación a homogeneidad de una bacteriocina, se suele proceder a la determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas y de su composición y secuencia aminoacídica. Sin embargo, ciertas bacteriocinas poseen aminoácidos modificados que pueden originar el bloqueo de la

reacción de secuenciación. En algunos casos, se puede obtener una secuenciación parcial mediante digestión con bromuro de cianógeno u otros agentes químicos. En estas situaciones, la identificación de la bacteriocina se puede conseguir mediante genética inversa, es decir, mediante la secuenciación del gen estructural de la bacteriocina y la deducción de la secuencia aminoacídica a partir de la nucleotídica (Martínez *et al.*, 2000c).

Finalmente, conviene destacar que los rendimientos obtenidos con los distintos protocolos de purificación han sido generalmente bajos e inviables para la obtención a gran escala de bacteriocinas purificadas, lo que ha motivado la búsqueda continua de protocolos más eficaces. En este contexto, diversos autores han generado anticuerpos específicos frente a diversas bacteriocinas (sección II.3.3.9.3.1) y han desarrollado protocolos de purificación, a partir de los sobrenadantes de las células productoras, en un sólo paso mediante cromatografía de inmovinoafinidad (Suárez *et al.*, 1997; Martínez, 2000; Rose *et al.*, 2001; Benech *et al.*, 2002b; Gutiérrez *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2004; Gutiérrez, 2005). Asimismo, se ha descrito la inmunopurificación de NisA empleando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos (Prioult *et al.*, 2000). En este sentido, las técnicas de inmunopurificación presentan algunas ventajas sobre los métodos tradicionales multicromatográficos, como son su sencillez y su mayor rendimiento (Gutiérrez, 2005).

II.3.3.6. MODO DE ACCIÓN

Las bacteriocinas pueden ejercer un modo de acción bactericida (provocando la muerte celular) o bacteriostático (inhibiendo el crecimiento celular) sobre las células sensibles, lo que depende de diversos factores tales como la dosis y el grado de purificación de la bacteriocina, el estado fisiológico de las células sensibles (fase de crecimiento) y las condiciones experimentales del ensayo (*e.g.*, temperatura, pH y presencia de compuestos antimicrobianos y de otros agentes que alteran la integridad de la pared celular) (Cintas *et al.*, 2001; Drider *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2009; Jacquet *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012). La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas hasta la fecha ejercen un modo de acción bactericida frente a los microorganismos sensibles, si bien algunas de ellas (*e.g.*, lactocina 27, leucocina A-UAL187 y LeuS) poseen un modo de acción bacteriostático (Cintas *et al.*, 2001).

De forma general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas (clases Ia y II) se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Jack *et al.*, 1995), mediante la formación de poros transitorios o de canales iónicos en la membrana (Abee, 1995). Este proceso de desestabilización de las membranas se desarrolla en tres etapas básicas: (i) unión de la bacteriocina a la membrana; (ii) inserción en la misma, y (iii) formación de poros y muerte celular (Abee, 1995; Hauge *et al.*, 1998; Montville y Chen, 1998; Moll *et al.*, 1999; Lee y Kim, 2011; Nishie *et al.*, 2012). La unión inicial de las bacteriocinas a las membranas citoplasmáticas está gobernada por interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas bacterianas (ácidos teicoicos, lipoteicoicos y teicurónicos). Asimismo, se conoce que algunos lantibióticos con actividad formadora de poros interaccionan con el lípido II (precursor de la síntesis del peptidoglicano) unido a la membrana citoplasmática, que actúa facilitando la

interacción de estos péptidos con las membranas de las células sensibles, es decir, como receptor o molécula *docking* (Fig. 2.8) (Hécharad y Sahl, 2002; Hoffmann *et al.*, 2002; Bauer y Dicks, 2005; Nes *et al.*, 2007). De manera similar, se ha sugerido que una de las subunidades del sistema fosfotransferasa (PTS, del inglés *PhosphoTransferase System*) manosa-específico (EII_t^{Man}) puede actuar como receptor de las bacteriocinas de la subclase IIa, ya que este sistema debe ser expresado para que las células sean sensibles a estas bacteriocinas (sección II.3.3.8) (Ramnath *et al.*, 2000; Dalet *et al.*, 2001; Hécharad *et al.*, 2001; Ramnath *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005a; Drider *et al.*, 2006; Kjos *et al.*, 2011). En cualquier caso, la existencia de bacteriocinas capaces de actuar en sistemas liposomales pone en duda la necesidad absoluta de un receptor proteico o de determinados componentes de la superficie celular para la actividad de las bacteriocinas (Chen *et al.*, 1997a; Herranz *et al.*, 2001b).

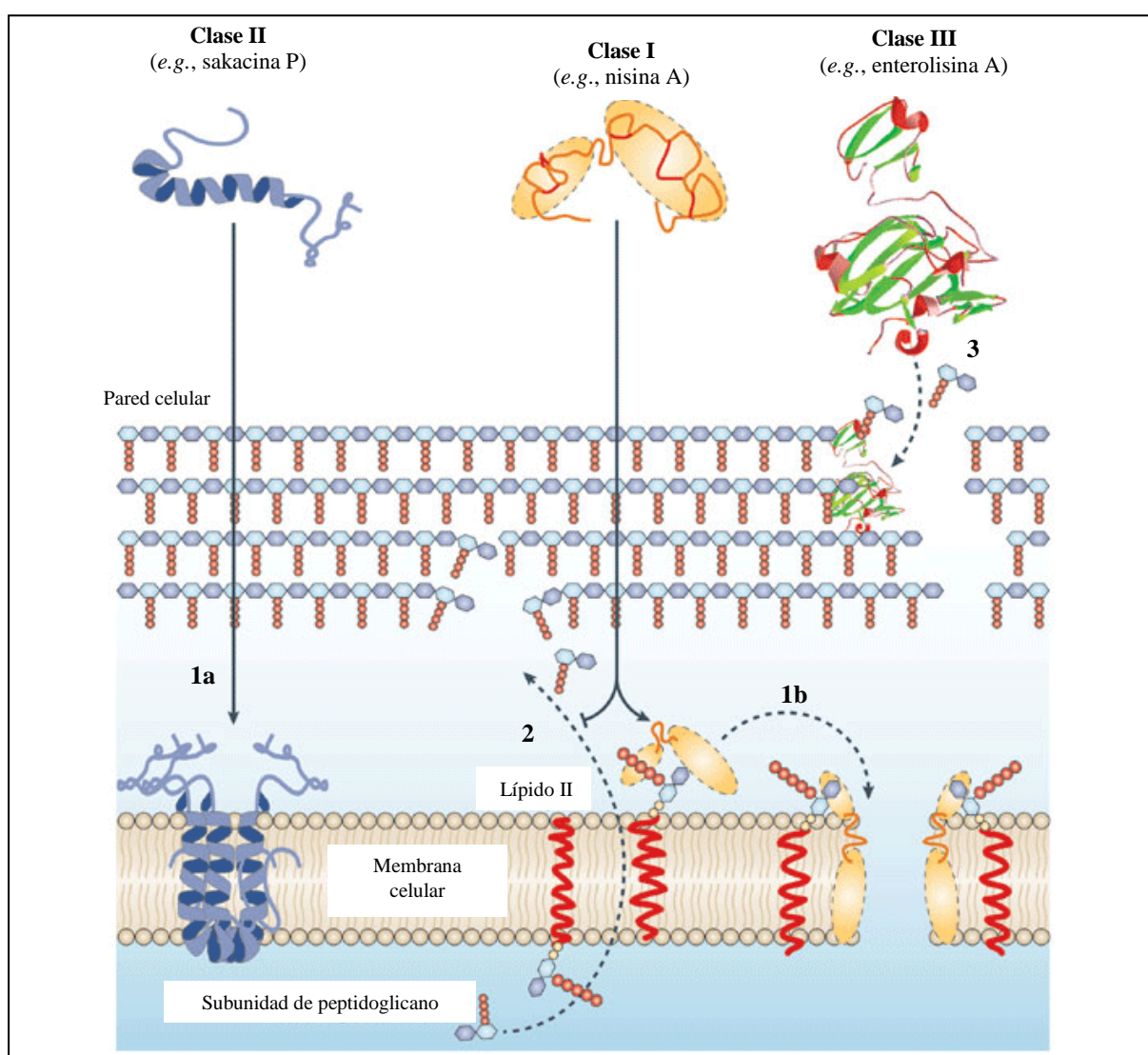


Figura 2.8. Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas: (i) formación de poros en la membrana, mediada o no por una molécula *docking* (1a y 1b, respectivamente); (ii) inhibición de la síntesis de la pared celular (2), e (iii) hidrólisis de la pared celular (3). Adaptado de Cotter *et al.* (2005b).

Actualmente, existen dos grandes modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas generan poros en las membranas citoplasmáticas (Fig. 2.9): (i) el modelo de “cuña”, aplicable a NisA y otros lantibióticos, según el cual las moléculas de bacteriocina se sitúan de forma paralela a la membrana, agregan y, posteriormente, se insertan en la membrana, formando un poro en el que también participan los lípidos de la membrana (Abee, 1995; Driessen *et al.*, 1995; Moll *et al.*, 1999), y (ii) el modelo de “duela de barril”, aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II, según el cual las bacteriocinas se integran en la membrana como monómeros y, luego agregan, estableciendo estructuras con forma de barril, en las que las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro, mientras que las caras hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana (Ojcius y Young, 1991; Abee, 1995; Moll *et al.*, 1999). En cualquier caso, la formación de poros posibilita un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos y ATP) que conduce a la disipación del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y/o del gradiente de pH (ΔpH), ambos componentes de la fuerza protón-motriz (PMF, del inglés *Proton Motive Force*, un gradiente electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía) (Montville y Bruno, 1994; Moll *et al.*, 1999). La alteración o colapso de la PMF provoca una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, que se hidroliza en un intento vano de reestablecer los gradientes iónicos disipados, por lo que se impide el transporte activo de nutrientes y el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones (H^+ , Na^+ , K^+ y Mg^{2+}) y se reduce la síntesis de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), lo que conduce al cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, origina la muerte celular (Moll *et al.*, 1999; Herranz, 2001). Finalmente, la actividad bactericida de las bacteriocinas puede ir acompañada de la lisis de las células sensibles (bacteriocinas bactericidas bacteriolíticas) (*e.g.*, NisA, plantaricina C y enterococcina EFS2) que se produce como consecuencia de la entrada masiva de agua y el consiguiente choque osmótico (Ojcius y Young, 1991) o de la activación de enzimas autolíticas asociados a la pared celular bacteriana (Jack *et al.*, 1995; Martínez-Cuesta *et al.*, 2000). No obstante, la acción de la mayoría de las bacteriocinas generalmente no causa lisis celular (*e.g.*, enterocina A [EntA], EntB, y enterocina 226 NWC, LciA y SakP) (Schillinger y Lücke, 1989; van Belkum *et al.*, 1991; Franz *et al.*, 1996, 1999b; Cintas *et al.*, 2001).

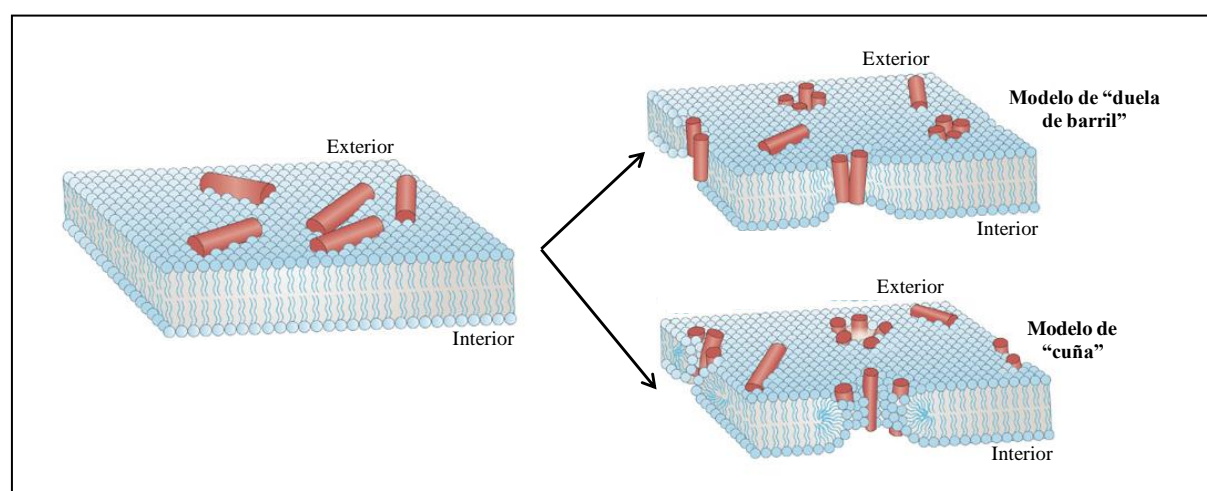


Figura 2.9. Modelos que explican la formación de poros por las bacteriocinas. Adaptado de Melo et al. (2009).

Por otra parte, conviene destacar que existen bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas con modos de acción diferentes a la formación de poros y/o con otras actividades biológicas (Hécharad y Sahl, 2002; Hoffmann *et al.*, 2002; Pag y Sahl, 2002b; Bauer y Dicks, 2005; Cotter *et al.*, 2005b), entre los que destacan: (i) la inhibición de la biosíntesis de la pared celular por algunos lantibióticos (*e.g.*, NisA, mersacidina y actagardina) (Fig. 2.8), mecanismo en el que está implicado el lípido II como molécula *docking*; (ii) la inhibición de la actividad de enzimas importantes, como la fosfolipasa A2 por algunos lantibióticos globulares (Ib) (*e.g.*, ancovenina, cinamicina y duramicina); (iii) la inhibición de la formación de septos durante la división de células bacterianas sensibles a la lactococcina 972 [Lci972], y (iv) la hidrólisis de la pared celular por las bacteriocinas de la clase III (*e.g.*, EnlA) (Fig. 2.8), que provoca la lisis de las células sensibles.

II.3.3.7. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS

Los determinantes genéticos asociados a la síntesis de las bacteriocinas forman agrupaciones génicas (*clusters*) compuestas por varios genes agrupados en uno, dos o, incluso, tres operones. Estas agrupaciones génicas (Fig. 2.10) constan generalmente de: (i) un gen que codifica la preprobacteriocina (gen estructural); (ii) un gen que codifica la proteína de inmunidad que protege a la célula productora de la toxicidad de la bacteriocina (gen de inmunidad); (iii) los genes responsables del procesamiento y transporte de la preprobacteriocina, que en el caso de transportadores del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1) requieren otro gen (gen de la proteína accesoria) que codifica una proteína accesoria esencial para la función de estos transportadores y, en algunos casos; (iv) los genes que codifican enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales de la probacteriocina (genes de modificación), y (v) los genes que codifican componentes involucrados en la regulación de la biosíntesis de la preprobacteriocina (genes de regulación) (Nes *et al.*, 1996; Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Pag y Sahl, 2002a, b; Chen y Hoover, 2003; Skaugen *et al.*, 2003; Nes *et al.*, 2012).

En lo que respecta a su localización, las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de las bacteriocinas pueden localizarse en plásmidos, en el cromosoma o, incluso, en transposones (Jack *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002). En este contexto, en cepas productoras de múltiples bacteriocinas, los genes implicados en su síntesis pueden localizarse: (i) en un único plásmido, como es el caso de LciA, LciB y LciM de *Lc. lactis* subesp. *cremoris* 9B4, codificadas en el plásmido p9B4-6 (van Belkum *et al.*, 1992); (ii) en el cromosoma, como es el caso de las plantaricinas N (PltN), EF (PltEF) y JK (PltJK) producidas por *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002), o (iii) en el cromosoma y en plásmidos diferentes, como es el caso de EntL50 (EntL50A y EntL50B), EntP y EntQ, producidas por *E. faecium* L50, codificadas en los plásmidos pCIZ1 (50 kb aprox.), pCIZ2 (7,4 kb) y en el cromosoma, respectivamente (Cintas *et al.*, 1998a; Criado *et al.*, 2006a); y carnobacteriocinas BM1 (CbnBM1), B2 (CbnB2) y CbnA producidas por *Carnobacterium piscicola* LV17, codificadas en el cromosoma y en los plásmidos pCP49 (72 kb) y pCP40 (61 kb), respectivamente (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995, 1997b). Por otra parte, conviene destacar que la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora, como se ha descrito en el

caso de algunas bacteriocinas (SakP, EntL50 [EntL50A y EntL50B] y EntAS-48) (Moreno *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005; Cocolin y Rantsiou, 2007).

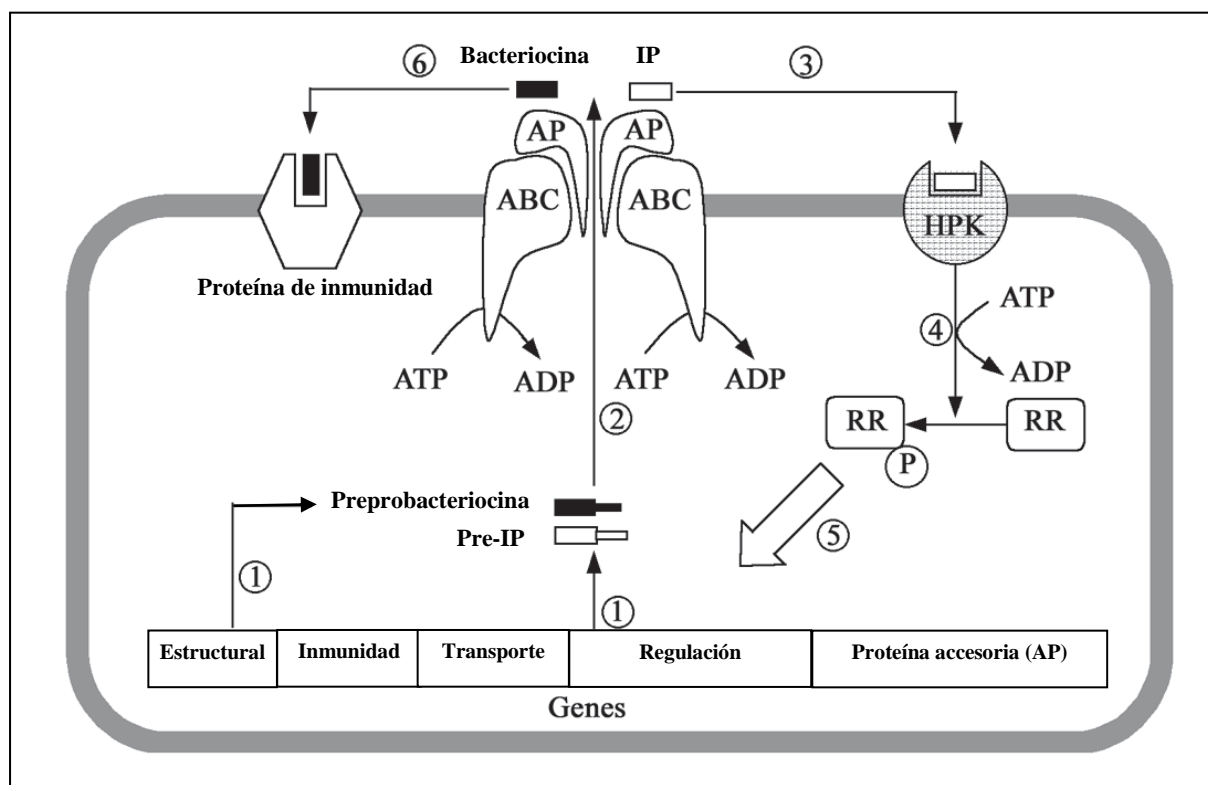


Figura 2.10. Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II. (1) Transcripción de los genes de la prebacteriocina y de otros genes asociados; (2) Transporte y procesamiento de la prebacteriocina y del IP a través de un transportador ABC; (3) Interacción del IP con la HPK e inducción de la fosforilación de esta proteína a expensas del ATP; (4) Transferencia del fosfato desde HPK a RR; (5) Activación de del promotor de la transcripción regulado por acción del RR fosforilado; (6) Interacción de la bacteriocina con la proteína de inmunidad. ABC, transportador del tipo ABC; AP, proteína accesoria del transportador del tipo ABC; HPK, proteína histidín-quinasa; IP, péptido inductor; RR, proteína reguladora de respuesta. *Adaptado de Chen y Hoover (2003).*

II.3.3.7.1. Gen(es) estructural(es)

La mayoría de los genes estructurales de las bacteriocinas de las bacterias lácticas codifican precursores biológicamente inactivos (prebacteriocinas) que contienen: (i) una extensión N-terminal, y (ii) un propéptido C-terminal (probacteriocina), que dará lugar a la bacteriocina madura (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001). Las extensiones N-terminales pueden ser: (i) secuencias líder del tipo “doble glicina” (Gly-Gly) (15–30 aa), reconocidas por los sistemas de transporte del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1) (Håvarstein *et al.*, 1994, 1995; Casaus, 1998; Herranz, 2001); (ii) secuencias líder del tipo FNLDV o tipo nisina (23–30 aa), reconocidas también por los sistemas de transporte del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1) (Nes y Johnsborg, 2004; de Jong *et al.*, 2006), o (iii) péptidos señales (SP, del inglés *Signal Peptide*) (18–30 aa), que permiten el procesado y la secreción de bacteriocinas por el sistema Sec (sección II.3.3.7.3.2). De forma general, estas extensiones desempeñan un papel fundamental

en el reconocimiento, procesamiento (eliminación de la extensión N-terminal) y la secreción al medio extracelular de las bacteriocinas. Asimismo, se ha sugerido que las extensiones N-terminales: (i) podrían intervenir en la modificación postraduccional de ciertos lantibióticos (Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003), y (ii) mantienen a las bacteriocinas biológicamente inactivas en el interior de la célula productora, protegiéndola de sus efectos tóxicos mientras permanecen en su interior (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996), si bien se ha descrito que el precursor de PedAcH/PedPA-1 posee actividad antimicrobiana (Ray *et al.*, 1999). No obstante, conviene destacar que, a pesar de que la práctica totalidad de las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas se sintetizan en forma de precursores inactivos, algunas bacteriocinas se sintetizan sin ningún tipo de extensión N-terminal, como es el caso de EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), EntQ (Cintas *et al.*, 2000d), enterocina EJ97 (EntEJ97) (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), enterocina MR10 (EntMR10 [EntMR10A y EntMR10B]) (Martín-Platero *et al.*, 2006), bacteriocina LsbB (Gajic *et al.*, 2003), aureocina A70 (AurA70 [AurA, AurB, AurC y AurD]) (Netz *et al.*, 2001) y aureocina A53 (Netz *et al.*, 2002), siendo su mecanismo de secreción desconocido hasta la fecha, salvo en el caso de las bacteriocinas LsbB, EntEJ97 y EntQ, en cuya secreción se conoce que intervienen transportadores ABC (Gajic *et al.*, 2003; Criado, 2006). Finalmente, las bacteriocinas pertenecientes a la subclase IIb (sistema de dos péptidos) (*e.g.*, EntL50 [EntL50A y EntL50B] y sakacina T [SakT (SakT α y SakT β)]]) contienen dos genes estructurales contiguos.

II.3.3.7.2. Gen(es) de inmunidad

En la mayoría de los bacteriocinas, el gen que codifica la proteína de inmunidad se localiza en el mismo operón que el gen estructural, de forma contigua y con idéntica orientación, de manera que la proteína de inmunidad específica se expresa concomitantemente con la bacteriocina, pero, a diferencia de ésta, no requiere un sistema de procesamiento y transporte ya que no se secreta al medio extracelular (Nes *et al.*, 1996). No obstante, en ocasiones, los genes de inmunidad tienen una localización atípica, como ocurre en las agrupaciones génicas de: (i) la bacteriocina LsbB de *Lc. lactis* BGM1 (Gajic *et al.*, 2003), EntB de *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al.*, 1999b) y CbnA de *C. piscicola* LV17A (Franz *et al.*, 2000), en las que se encuentran situados próximos al gen estructural pero con orientación contraria, y (ii) la munditocina KS de *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto *et al.*, 2002), en la que los genes estructural, de transporte y de inmunidad, contiguos y con la misma orientación, se encuentran situados en un único operón, si bien el gen de transporte se encuentra situado entre el gen estructural y el de inmunidad.

De forma general, las proteínas de inmunidad se caracterizan por su pequeño tamaño molecular (51–154 aa) y su elevado pI (7–10), así como por la presencia de posibles segmentos hidrofóbicos transmembrana, lo que sugiere que podrían integrarse en las membranas citoplasmáticas de las células productoras de bacteriocinas para ejercer su acción protectora (Fremaux *et al.*, 1993; Diep *et al.*, 1996, 2007; Nes *et al.*, 2012).

En lo que respecta al mecanismo molecular de acción de las proteínas de inmunidad, que en la actualidad no ha sido completamente elucidado, en el caso de la LciA, Venema *et al.* (1994) sugirieron que esta proteína podría interaccionar a través de su segmento transmembrana con una proteína

transmembrana que funcionara como receptor de la bacteriocina, lo que dificultaría su inserción en la membrana y, por lo tanto, su acción antimicrobiana. Posteriormente, otros autores también sugirieron que las proteínas de inmunidad actuarían alterando la interacción entre la bacteriocina y su hipotético receptor localizado en la membrana (Quadri *et al.*, 1995; Sprules *et al.*, 2004).

Por otra parte, Abee (1995) sugirió que las proteínas de inmunidad podrían interaccionar con las bacteriocinas en el medio extracelular para impedir su interacción con las membranas y la consiguiente formación de poros. No obstante, esta hipótesis se descartó tras demostrarse que: (i) las proteínas de inmunidad de LciA (Venema *et al.*, 1994) y CbnB2 (Quadri *et al.*, 1995) no son activas desde el exterior celular, y (ii) la localización de la proteína de inmunidad de la mesentericina Y105 (MesY105) es intracelular (Johnsen *et al.*, 2004). El modelo propuesto por Abee (1995) también sugería que la proteína de inmunidad podría interaccionar con las moléculas de bacteriocina integrantes de los poros de membrana, desestabilizándolos y/o sellándolos. No obstante, resulta poco probable que exista una interacción directa entre la bacteriocina y su proteína de inmunidad, ya que la homología entre las proteínas de inmunidad de bacteriocinas estrechamente relacionadas es escasa (Nes *et al.*, 1996; Fimland *et al.*, 2002a; Nes *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado a este respecto que la estructura tridimensional de las proteínas de inmunidad de CbnB2 y EntA es muy similar a pesar de conferir resistencia a bacteriocinas con secuencias aminoacídicas muy diferentes, ya que ambas presentan cuatro hélices α (Sprules *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005b; Drider *et al.*, 2006).

Otros estudios más recientes encaminados a elucidar el mecanismo molecular de acción de las proteínas de inmunidad (Johnsen *et al.*, 2004, 2005a) han mostrado que la mitad C-terminal de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa contiene una región implicada en el reconocimiento específico, directo o indirecto, del extremo C-terminal de las bacteriocinas frente a las que confiere inmunidad; asimismo, estos estudios han puesto de manifiesto que las proteínas de inmunidad no interaccionan estrechamente con la membrana citoplasmática, sino que pueden estar asociadas a ella débilmente como proteínas de membrana periféricas, lo que permitiría su interacción con las bacteriocinas. Así pues, de acuerdo con este modelo la bacteriocina y la proteína de inmunidad se situarían en lados opuestos de la membrana celular, por lo que no existiría contacto directo entre ambas moléculas (Johnsen *et al.*, 2004; Fimland *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005a; Drider *et al.*, 2006). No obstante, puesto que existe cierta variación (dependiente de la cepa bacteriana) en la funcionalidad de las proteínas de inmunidad (Fimland *et al.*, 2002a; Johnsen *et al.*, 2004), no se descarta la posibilidad de que estas proteínas pudieran interaccionar indirectamente con las bacteriocinas a través de componentes celulares (*e.g.*, el hipotético receptor de las bacteriocinas) que variaran, en cierto modo, en las distintas cepas (Fimland *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005a).

Adicionalmente, algunos transportadores del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1) están implicados en la inmunidad frente a bacteriocinas mediante la eliminación activa de las moléculas que consigan penetrar en la membrana desde el medio extracelular, lo que evita su acumulación en la membrana (Young y Holland, 1999; Stein *et al.*, 2005). Este mecanismo de inmunidad se ha descrito en la mayoría de los lantibióticos, salvo en el caso de Pep5, epicidina 280, Cyl y lactocina S (Skaugen *et al.*, 2003), y puede

constituir el único mecanismo de inmunidad presente, tal es el caso de Ltn481 (Rincé *et al.*, 1997), o un mecanismo de inmunidad adicional al de la típica proteína de inmunidad, como ocurre en el caso de NisA (Siezen *et al.*, 1996) y la subtilina (Klein y Entian, 1994). Por consiguiente, en estos sistemas existen dos transportadores del tipo ABC, uno implicado en la secreción del precursor del lantibiótico y el otro en la inmunidad frente a su forma madura. A este respecto, conviene destacar que no existen homologías entre ambos transportadores y que, además, su configuración es diferente, ya que en el transportador del tipo ABC implicado en la secreción, sus dos dominios forman parte de un único polipéptido, mientras que en el transportador del tipo ABC implicado en la inmunidad cada dominio se sintetiza de manera independiente (Young y Holland, 1999). Por otra parte, también se han descrito transportadores del tipo ABC implicados en la inmunidad frente a algunas bacteriocinas de la clase II, como en el caso de EntAS-48 (Díaz *et al.*, 2003), CirA (Kemperman *et al.*, 2003) y bacteriocinas LsbA y LsbB (Gajic *et al.*, 2003). Es interesante destacar el caso especial de las bacteriocinas LsbA y LsbB, en el que LmrB es un transportador MDR (del inglés, *Multidrug Resistance*) del tipo ABC con función dual, responsable tanto del transporte como de la inmunidad de la bacteriocina LsbA (sintetizada con secuencia líder) y de la bacteriocina LsbB (sintetizada sin extensión N-terminal) (Gajic *et al.*, 2003). De forma similar, es probable que los transportadores ABC EntL50GHJ y EntQB de *E. faecium* L50 ejerzan una función dual, estando implicados en la secreción de EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntQ, respectivamente, y en la inmunidad frente a estas bacteriocinas (Criado, 2006).

II.3.3.7.3. Genes de transporte y procesamiento

En todas las células, las proteínas extracitoplasmáticas deben transportarse a través de una o varias bicapas lipídicas hasta alcanzar su destino final. En la mayoría de los casos, estas proteínas se sintetizan en forma de precursores inactivos con una extensión N-terminal del tipo péptido señal (SP, del inglés *Signal Peptide*) que actúa como lugar de reconocimiento para su transporte, procesamiento y secreción por la Ruta General de Secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*) o sistema Sec (van Wely *et al.*, 2001; Natale *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas proteínas y otros compuestos de diversa naturaleza pueden secretarse mediante sistemas específicos como: (i) el sistema de transporte del tipo ABC, también denominado sistema de secreción tipo I o sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés *Dedicated Transport System*); (ii) el sistema de secreción dependiente de contacto o de tipo III, también conocido como “inyectosoma” (Plano *et al.*, 2001); (iii) el sistema de tipo IV de translocación de proteínas y ADN, también dependiente de contacto (Christie, 2001); (iv) el sistema de autotransporte o tipo V (Desvaux *et al.*, 2004), y, por último, (v) el recientemente descrito sistema de transporte tipo VI, implicado en la virulencia de ciertos patógenos Gram-negativos (Pukatzki *et al.*, 2006).

En lo que se refiere a las bacteriocinas de las bacterias lácticas, la mayoría de estos péptidos se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina y se secretan por la acción de un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, cuyos genes se encuentran generalmente ligados al gen estructural y al de inmunidad (Nes *et al.*, 1996). No obstante, dentro de la clase II, también existen algunas bacteriocinas que se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP que permite su reconocimiento y secreción a través del sistema Sec en ausencia de transportadores específicos. A

continuación, se describen las características más relevantes de ambos sistemas así como su implicación en la secreción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.

II.3.3.7.3.1. Sistema de transporte del tipo ABC o sistema de transporte dedicado

Los sistemas de transporte del tipo ABC, presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se encargan tanto de la internalización como de la secreción de muchas sustancias (*e.g.*, antibióticos, aminoácidos, péptidos y proteínas, azúcares y bacteriocinas), además de intervenir en numerosos procesos celulares y su regulación (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001; Lorca *et al.*, 2010). Estos transportadores constituyen una de las más numerosas familias de proteínas y, de hecho, se ha demostrado que casi el 5% del genoma de *E. coli* está constituido por genes que codifican componentes de este sistema de transporte (Higgins, 2001; Lorca *et al.*, 2010).

Los sistemas de transporte ABC están compuestos por un miembro de la familia de los transportadores del tipo ABC, una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, una proteína de la membrana externa (Fig. 2.11). Los genes que codifican el transportador del tipo ABC y la proteína accesoria suelen ser contiguos, mientras que el que codifica la proteína de la membrana externa puede localizarse a continuación o independientemente de los dos anteriores (Håvarstein *et al.*, 1995; Franke, 1998).

Los transportadores del tipo ABC clásicos son homodímeros que constan de cuatro dominios: dos dominios transmembrana (TMD, del inglés *Transmembrane Domain*), situados en la región N-terminal, y dos dominios de unión al ATP, localizados en el extremo C-terminal (Higgins, 2001). Los TMD son hidrófobos y, generalmente, contienen seis segmentos transmembrana (TMS, del inglés *Transmembrane Segment*) mientras que los dominios de unión al ATP son hidrófilos y se encuentran situados en el lado citoplasmático de la membrana, donde también se sitúa el extremo N-terminal (Håvarstein *et al.*, 1995; Wandersman, 1998; Lorca *et al.*, 2010). Generalmente, estos cuatro dominios se disponen como péptidos independientes aunque en ocasiones pueden unirse y actuar como un complejo polipeptídico. Por otra parte, la proteína accesoria posee una región N-terminal localizada en el citoplasma (aprox., 20 aa), un dominio central integral transmembrana y una región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática que conecta con el extremo N-terminal mediante un TMS (Franke, 1998). La función exacta de las proteínas accesorias aún no se ha determinado con exactitud; no obstante, se conoce que en las bacterias Gram-positivas resultan imprescindibles para la secreción de algunas bacteriocinas (Skaugen *et al.*, 2003), mientras que en las Gram-negativas serían las encargadas de conectar la membrana interna con la externa, por lo que se denominan “proteínas de fusión de membrana” (Franke, 1998; Gajic, 2003). Adicionalmente, en las bacterias Gram-negativas, las proteínas o sustancias liberadas al espacio periplásmico por este sistema de secreción requieren de la presencia de un polipéptido de la membrana externa, que permite su paso al exterior mediante la formación de un poro hidrófilo en la misma.

Con base en sus características funcionales, los transportadores del tipo ABC procariotas pueden clasificarse en los siguientes grupos (Dassa y Bouige, 2001; Davidson *et al.*, 2008; Lorca *et al.*, 2010):

1. Importadores. Transportadores específicos de procariotas cuya función es proveer de nutrientes esenciales a las bacterias, incluso si éstos se encuentran a concentraciones muy pequeñas en el medio extracelular. En este tipo de transportadores los cuatro dominios actúan por separado y requieren de la presencia de una proteína de unión al sustrato para que el transporte sea eficaz.
2. Exportadores. Estos transportadores se encargan del transporte y/o secreción de numerosas sustancias, como por ejemplo: (i) antibióticos; (ii) polisacáridos de la pared celular; (iii) precursores peptídicos sintetizados con una extensión N-terminal (secuencia líder) del tipo Gly-Gly (sección II.3.3.7.1), como ColV y la mayoría de la bacteriocinas sintetizadas por las bacterias lácticas; y (iv) péptidos que carecen de extensión N-terminal, como la toxina α -hemolisina de *E. coli*, EntEJ97, AurA70 y las bacteriocinas LsbB, EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntQ (Herranz, 2001; Higgins, 2001; Gajic *et al.*, 2003; Criado, 2006). Asimismo, algunos de estos transportadores son responsables de la externalización activa de sustancias nocivas para las bacterias, tales como antibióticos y una amplia gama de compuestos no relacionados ni estructural ni funcionalmente entre sí, pero generalmente caracterizados por su naturaleza lipofílica y/o catiónica. Debido a su participación en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos estos transportadores se conocen como transportadores MDR (Lubelski *et al.*, 2007). En general, en los transportadores del tipo exportador, los cuatro dominios se encuentran fusionados formando un único complejo polipeptídico y necesitan de una proteína accesoria y, en el caso de las bacterias Gram-negativas, de una proteína de la membrana externa para ser funcionales.
3. Reguladores. Transportadores que carecen de dominios TMD, y que intervienen en la regulación de procesos celulares como la reparación del ADN, la traducción de proteínas o la expresión de diversos genes.

En el caso concreto de las bacteriocinas secretadas mediante este sistema, los transportadores son específicos para cada una de estas moléculas y están constituidos por un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, cuyos genes son contiguos, se coexpresan y, además, se encuentran ligados generalmente al gen estructural y al de inmunidad formando un único operón (Nes *et al.*, 1996, 2002, 2012). No obstante, CbnBM1 producida por *C. piscicola* LV17 constituye un caso especial, ya que, a pesar de que sus genes estructural y de inmunidad se localizan en el cromosoma, su síntesis depende de la presencia del plásmido pCP40 (61 kb), que codifica un transportador del tipo ABC y que contiene el gen estructural y de inmunidad de CbnB2 (Quadri *et al.*, 1994, 1997b; Saucier *et al.*, 1997). Así pues, *C. piscicola* LV17 constituye, además, un ejemplo de cepa productora de múltiples bacteriocinas que comparten el mismo mecanismo de transporte. A este respecto, conviene destacar que en las cepas productoras de múltiples bacteriocinas es común encontrar un único transportador del tipo ABC implicado en el transporte de todas ellas, si bien esto ocurre generalmente cuando sus precursores muestran una elevada homología en sus secuencias líder (Eijsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). Por otra parte, en algunas bacteriocinas carentes de extensión N-terminal, como es el caso de las bacteriocinas LsbB (Gajic *et al.*, 2003), EntQ (Criado *et al.*, 2006a) y, probablemente, EntL50A y EntL50B (Criado, 2006), los transportadores del tipo ABC posiblemente ejerzan una función dual, estando encargados tanto del transporte de estas moléculas como de la inmunidad frente a las mismas.

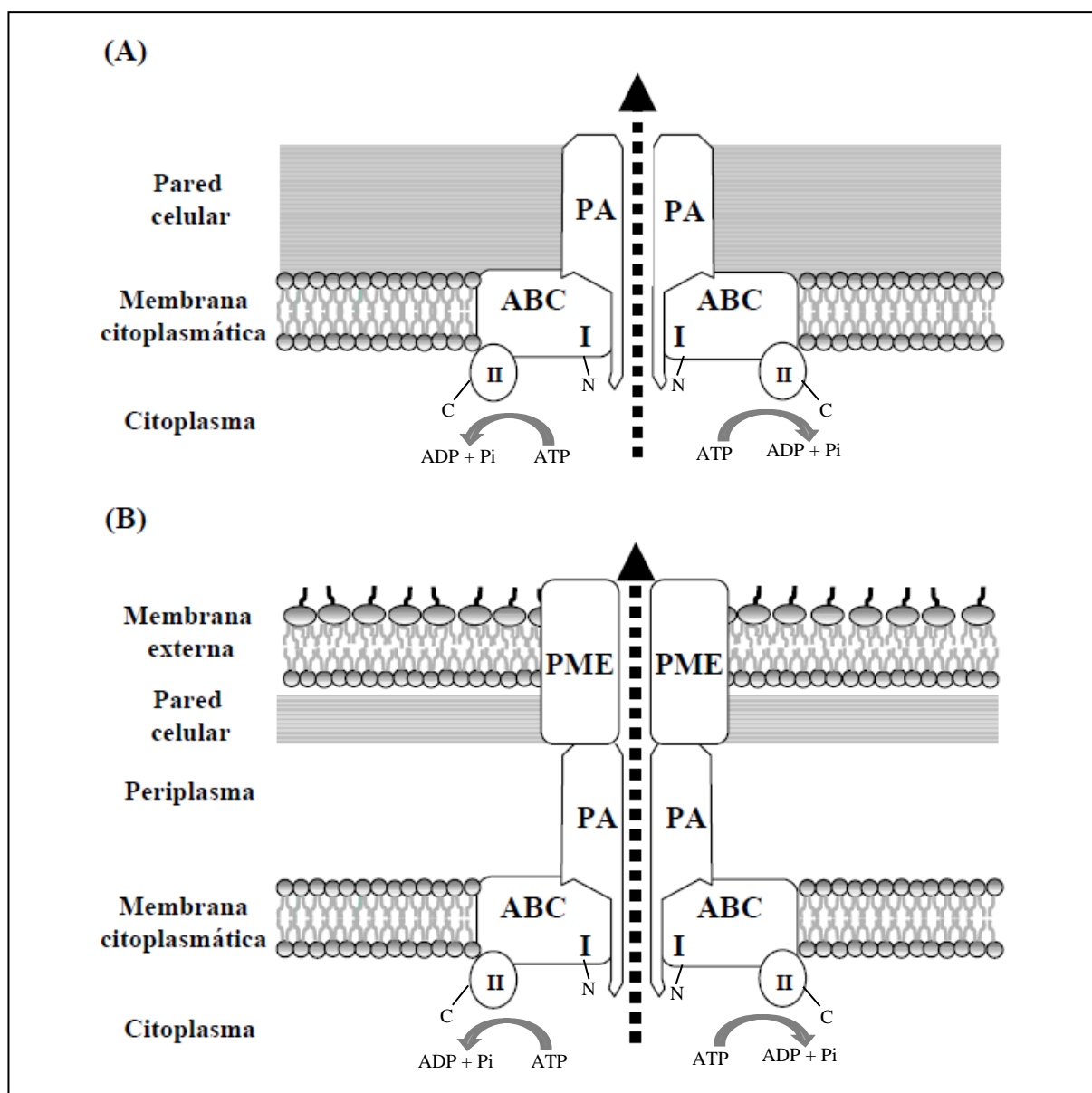


Figura 2.11. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B). La proteína transportadora (ABC) consta de un dominio hidrofóbico N-terminal (I), que en la mayoría de los casos contiene seis TMS, y de un dominio C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador ABC y, en las bacterias Gram-negativas, con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación a través de las membranas citoplasmáticas y, en su caso, externa. *Adaptado de Franke (1998).*

Los transportadores del tipo ABC de bacteriocinas son generalmente homodímeros de aproximadamente 700 aminoácidos, que difieren de los transportadores ABC clásicos en que, además de presentar un dominio central integrado en la membrana (aprox., 300 aa) constituido por cuatro o seis TMS y de carácter hidrofóbico, y un dominio C-terminal (aprox., 250 aa) con actividad ATPasa localizado en la cara interna de la membrana citoplasmática, presentan un dominio N-terminal (aprox., 150 aa) adicional con función proteolítica que contiene residuos conservados de Cys e His y que se localiza asimismo en la cara interna de la membrana citoplasmática. La función de este dominio consiste en el reconocimiento de la preprobacteriocina y en la posterior hidrólisis de su secuencia líder tras los dos residuos Gly situados en las posiciones -1 y -2 con respecto al punto de corte de su secuencia líder.

Adicionalmente, para la secreción de algunas bacteriocinas es imprescindible la presencia de la proteína accesoria de membrana, aunque su función exacta en este proceso es desconocida (Schneider y Hunke, 1998; Young y Holland, 1999; Dassa, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Gajic, 2003). El mecanismo de transporte de los precursores de bacteriocinas que contienen secuencias líder del tipo Gly-Gly fue propuesto por Håvarstein *et al.* (1995). En dicho modelo, cada uno de los dos dominios proteolíticos del homodímero del transportador del tipo ABC, así como los dos dominios C-terminales, unirían sendos precursores (preprobacteriocinas) y moléculas de ATP, respectivamente, de manera que la energía liberada por la hidrólisis del ATP induciría un cambio conformacional en el transportador que tendría como resultado el procesamiento y la translocación concomitante de la probacteriocina a través de la membrana.

II.3.3.7.3.2. Sistema Sec o ruta general de secreción

La principal ruta de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática bacteriana es el sistema Sec o ruta general de secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*). Los péptidos o proteínas que utilizan esta ruta se sintetizan como precursores con una extensión N-terminal del tipo SP que asegura su correcta aproximación a la membrana citoplasmática (Pugsley, 1993; Driessen *et al.*, 2002; Driessen y Nouwen, 2008; Natale *et al.*, 2008), se transportan a través de la misma mediante un complejo proteico denominado translocasa y, finalmente, se procesan por la acción de una peptidasa señal antes de ser liberados al medio extracelular.

Los SP son extensiones N-terminales de 18 a 30 aminoácidos presentes en algunos precursores proteicos que, aunque no presentan homologías en su secuencia primaria, poseen tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes (Fekkes y Driessen, 1999; Mori e Ito, 2001; van Roosmalen *et al.*, 2004; Kuipers *et al.*, 2006):

1. Dominio N. Consta de 1–5 aminoácidos y posee una carga neta positiva que es superior en los SP de las bacterias Gram-positivas. Este dominio interacciona con la proteína SecA y con los fosfolípidos de carga negativa de la membrana citoplasmática, por lo que es importante para la entrada de las preproteínas en la ruta de translocación.
2. Dominio H. Compuesto por 7–15 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica que pueden adoptar una conformación en hélice- α . Frecuentemente, en la mitad de esta región se localiza un residuo de Gly o Pro que rompe la estructura de hélice- α de la zona, favoreciendo que el SP adopte una estructura similar a una “horquilla”, lo que le permite insertarse en la bicapa lipídica. Este dominio constituye la parte más importante del SP, puesto que su longitud e hidrofobicidad están directamente correlacionadas con la eficacia de la translocación.
3. Dominio C. Integrado por 3–7 aminoácidos y de carácter polar. Constituye la única zona del SP que necesita cierta especificidad en su estructura primaria, puesto que contiene el sitio de corte de la peptidasa señal que procesará el SP.

Solamente algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A (DivA) (Worobo *et al.*, 1995), la bacteriocina 32 (Inoue *et al.*, 2006), EntP

(Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Herranz y Driessen, 2005), Lci972 (Martínez *et al.*, 2000a), bacteriocina T8 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2006), EnlA (Nilsen *et al.*, 2003), la enterocina V583 (Swe *et al.*, 2007) y la hiracina JM79 (HirJM79) (Sánchez *et al.*, 2007b), se sintetizan con extensiones N-terminales del tipo SP reconocidas por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec.

A continuación se describen los principales componentes de la translocasa bacteriana. La mayoría de las características y propiedades que se citan hacen referencia a *E. coli* puesto que su translocasa es la más estudiada; no obstante se han descrito sistemas homólogos en *Bacillus subtilis*, células eucariotas y arqueas (van Wely *et al.*, 2001; Kuipers *et al.*, 2006; Driessen y Nouwen, 2008; Natale *et al.*, 2008).

II.3.3.7.3.2.1. Componentes integrales de membrana de la translocasa

El núcleo de la translocasa está constituido por un complejo heterotrimérico formado por las proteínas integrales de membrana SecY, SecE y SecG. El complejo SecYEG actúa como un canal conductor facilitando tanto la integración de proteínas en la membrana como su movimiento a través de la misma para ser secretadas. Aunque no es indispensable para la translocación, la asociación de SecYEG con el complejo heterotrimérico SecDFYajC aumenta la eficacia de este proceso (Driessen *et al.*, 1998; Mori e Ito, 2001; Driessen y van der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). En este sentido, aunque la función de este complejo no se conoce con exactitud, se ha propuesto su participación en: (i) el control de los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana asociados al proceso de translocación; (ii) el mantenimiento de la PMF durante el proceso de translocación, y (iii) la liberación de las proteínas translocadas (Rusch y Kendall, 2007). Por otra parte, YidC es una proteína esencial en *E. coli* que está implicada en la inserción de proteínas de membrana y que puede funcionar tanto de forma independiente como en cooperación con SecYEG-SecDFYajC (Yuan *et al.*, 2010).

II.3.3.7.3.2.2. SecB y partícula reconocedora de señal (SRP)

Los precursores proteicos pueden alcanzar el núcleo de la translocasa: (i) de forma directa guiados por el SP; (ii) dirigidos por SecB, una chaperona molecular citosólica presente únicamente en bacterias Gram-negativas; y (iii) mediante la ruta de la partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés *Signal Recognition Particle*). En *E. coli* esta última ruta se emplea fundamentalmente para el transporte de proteínas que se insertan en la membrana. El mecanismo de transferencia de estas proteínas hacia la translocasa consiste en la unión de SRP al SP de la proteína a medida que ésta emerge del ribosoma, su traslado hacia la membrana y su interacción con el receptor FtsY; finalmente, la hidrólisis de GTP por esta última proteína promueve la disociación del complejo SRP-proteína y la transferencia de ésta hacia la translocasa (Driessen y van der Does, 2002). En lo que respecta a las bacterias Gram-positivas, estudios de proteómica recientes han puesto de manifiesto que en *B. subtilis* la ruta SRP, además de participar en la integración de proteínas de membrana, se encarga de dirigir una gran proporción de las proteínas secretadas por este microorganismo hacia el núcleo de la translocasa. Esta observación sugiere la existencia de determinantes de especificidad no identificados hasta la fecha en los SP de estas proteínas que serían responsables de su dependencia de la ruta dependiente de SRP (Yuan *et al.*, 2010).

II.3.3.7.3.2.3. SecA y mecanismo de translocación proteica

SecA es una proteína con actividad ATPasa que se halla unida periféricamente al complejo SecYEG y que desempeña un papel fundamental en el mecanismo de translocación proteica al interconectar la hidrólisis del ATP con la translocación del precursor proteico a través de la membrana plasmática (Mori e Ito, 2001; Driessen y van der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). Cuando se encuentra unida a SecYEG, SecA posee gran afinidad por SecB, el SP y la región madura de las preproteínas. SecA funciona como un homodímero en el que cada uno de sus monómeros está constituido por dos regiones de unión a nucleótidos (NBS, del inglés *Nucleotide-Binding Sites*), NBS1 y NBS2. La unión del precursor proteico a SecA estimula el intercambio de ADP por ATP en uno de sus dos sitios de unión al ATP y provoca la inserción de SecA y de parte del precursor en la membrana. A continuación, la hidrólisis del ATP permite la desinserción de SecA, así como la liberación de la preproteína y la entrada de un segmento de aprox. 2,5 kDa de la misma en la ruta de translocación (Driessen y van der Does, 2002; Lewin, 2004; Natale *et al.*, 2008). La sucesión de ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana acoplados a la hidrólisis de ATP resulta en la translocación de la totalidad del precursor proteico que, una vez procesado por la peptidasa señal, será liberado al medio extracelular.

II.3.3.7.3.2.4. Peptidasa señal

Las peptidasas señal son endopeptidasas de membrana encargadas de la eliminación del SP de las preproteínas durante o inmediatamente después de su translocación a través de la membrana. De manera general, las peptidasas señal pueden clasificarse en dos tipos: (i) tipo I, que incluye a aquellas que actúan sobre precursores de proteínas distintas de las lipoproteínas, y (ii) tipo II, que engloba a las que se encargan del procesamiento de precursores de lipoproteínas (Paetzel *et al.*, 2002; van Roosmalen *et al.*, 2004). En bacterias Gram-negativas, la peptidasa señal de tipo I mejor caracterizada es la de *E.coli*, denominada Lep (del inglés *Leader peptidase*). Esta peptidasa consta de dos TMS en su extremo N-terminal y de un dominio catalítico C-terminal, estando localizados tanto el extremo N-terminal del primer TMS como el extremo C-terminal del segundo TMS en el periplasma (Fig. 2.12) (Dalbey *et al.*, 1997).

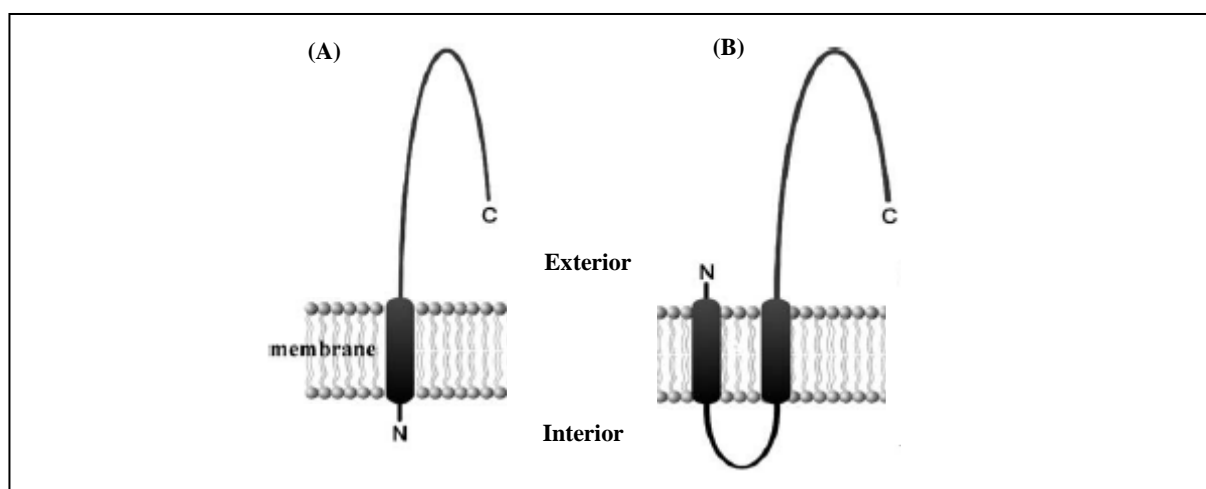


Figura 2.12. Representación esquemática de la topología de membrana de una peptidasa señal de tipo I de *B. subtilis* (A) y la Lep de *E. coli* (B). Adaptado de van Roosmalen et al. (2004).

En bacterias Gram-positivas, a diferencia de lo que ocurre en las Gram-negativas, es frecuente la existencia de múltiples peptidasas señal; así, por ejemplo, en *B. subtilis* se han descrito cinco de estas endopeptidasas, denominadas SipS, SipT, SipU, SipV y SipW, que muestran especificidades de sustrato distintas. En lo que se refiere a su estructura, las peptidasas señal de estas bacterias están ancladas en la membrana normalmente por un único TMS localizado en su extremo N-terminal (Fig. 2.12) (van Roosmalen *et al.*, 2004).

Por otra parte, con respecto a su mecanismo catalítico, las peptidasas señal se engloban dentro de un grupo especial de serín peptidasas debido a que contienen residuos estrictamente conservados de Ser, Lys y Asp esenciales para su actividad (van Roosmalen *et al.*, 2004). Asimismo, se conoce que estas enzimas presentan especificidad por las posiciones -3 y -1 (con respecto al punto de corte) del SP, las cuales suelen estar ocupadas por aminoácidos con cadenas laterales cortas y neutras, como Ala, Gly, Ser o Thr.

El resultado final del procesamiento del SP de la preproteína por la peptidasa señal es la liberación de la proteína en su forma madura al espacio periplásmico o extracelular y la adopción por parte de la misma de su conformación nativa definitiva (Fig. 2.13).

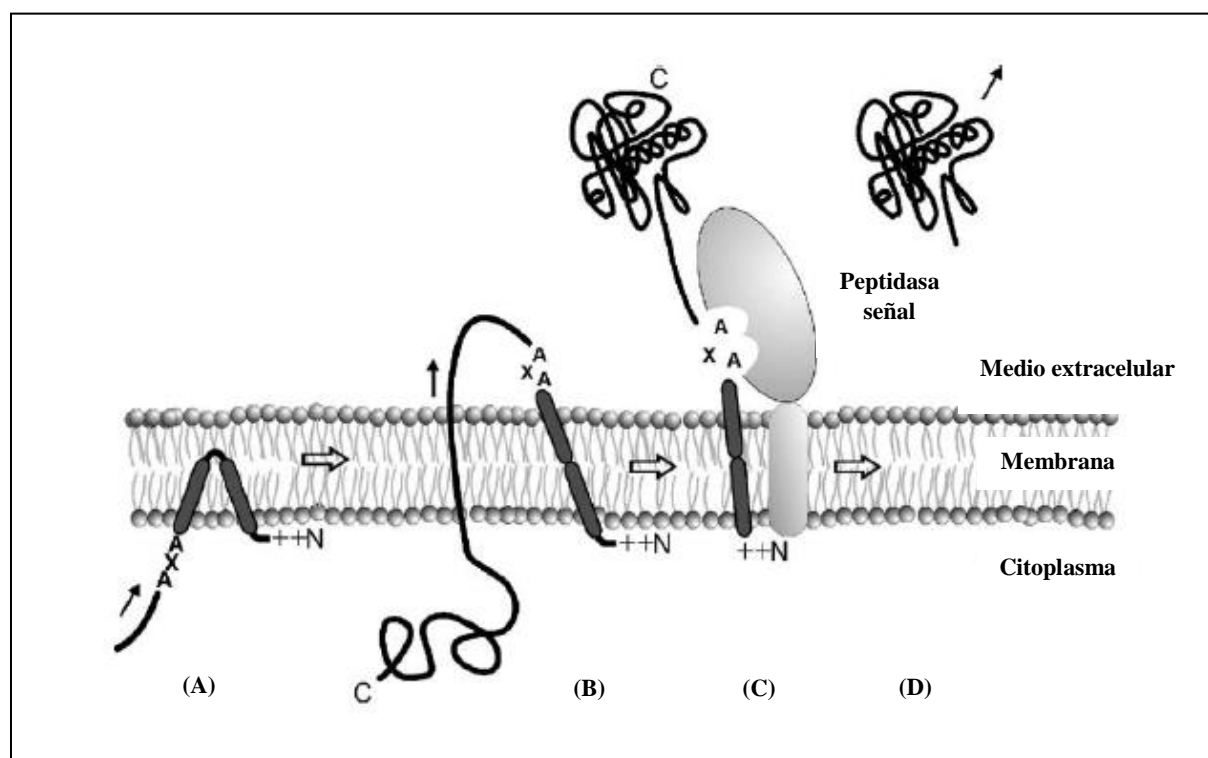


Figura 2.13. Modelo de inserción del SP en la membrana citoplasmática y procesamiento por la peptidasa señal. Primero, el dominio N del SP, cargado positivamente, interactúa con el interior de la membrana plasmática, cargada negativamente, y el dominio H del SP se inserta en forma de horquilla en la membrana citoplasmática (A). A continuación, el dominio H se extiende, lo que provoca que el inicio de la proteína madura pase a través de la membrana (B). Durante o inmediatamente después de la translocación por el transportador el SP es eliminado por la peptidasa señal, de forma que la proteína madura se libera de la membrana (C). Por último, después de la translocación a través de la membrana, la proteína madura se pliega adoptando su conformación nativa definitiva (D). En la figura no se muestran los componentes de la translocasa. Adaptado de van Roosmalen *et al.* (2004).

Como resumen de lo descrito en este apartado, en la Fig 2.14 se muestran los componentes de la translocasa de *E. coli* y las rutas involucradas en el traslado de las preproteínas hacia el núcleo de la translocasa.

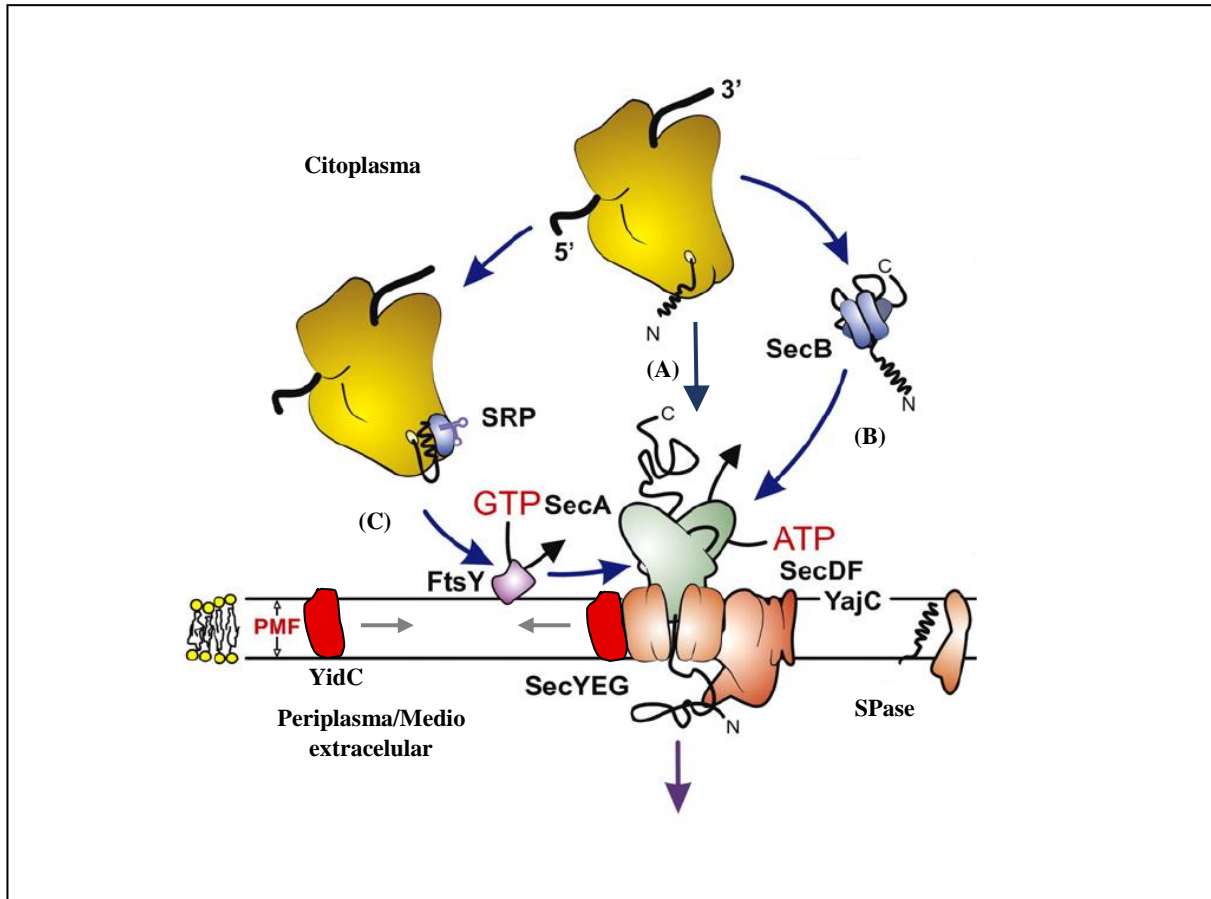


Figura 2.14. Transporte y procesamiento de proteínas mediante la translocasa Sec. En las bacterias, los componentes principales de la translocasa Sec son: (i) la proteína periférica de membrana SecA (en verde), que actúa como motor del proceso de translocación mediante la hidrólisis de ATP; (ii) el complejo proteico SecYEG (en marrón), que constituye el canal conductor de los precursores proteicos a través de la membrana; (iii) las proteínas de membrana accesorias SecDF y YajC (en marrón) que incrementan la eficiencia del proceso de translocación, e (iv) YidC (en rojo), una proteína implicada en la inserción de proteínas de membrana que puede funcionar tanto de forma independiente como en cooperación con SecYEG-SecDFYajC. Cuando una proteína provista de un péptido señal (SP) emerge del ribosoma puede alcanzar la translocasa postraduccionalmente o simultáneamente a su traducción. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente con el núcleo de la translocasa (A) o bien es conducido hacia el mismo por la chaperona SecB (B). En el segundo caso, la preproteína se asocia con la partícula reconocedora de señal (SRP) y, a través de FtsY (en violeta), interacciona con el núcleo de la translocasa (C). Finalmente, la peptidasa señal (SPase, en naranja) es una proteína de membrana encargada de eliminar el SP del precursor proteico durante o inmediatamente después de su translocación. PMF: Fuerza Protón Motriz (del inglés, *Proton Motive Force*). Adaptado de Natale et al. (2008).

II.3.3.7.4. Genes de regulación de la producción: sistema de transducción de señal de tres componentes

La producción de bacteriocinas puede ser considerada como un proceso con una única función: la inhibición de la microbiota que compite por un sustrato o nutriente limitado; por lo tanto, parece razonable considerar que la capacidad de producir bacteriocinas de forma regulada en función de los niveles de algun(os) factor(es) ambiental(es) puede representar una ventaja adaptativa para la cepa bacteriocinogénica favorecida por la selección natural (Skaugen *et al.*, 2003).

En numerosas ocasiones, la capacidad de producir bacteriocinas constituye un fenotipo inestable que puede perderse por diversas razones como: (i) inestabilidad plasmídica (en el caso de bacteriocinas codificadas en plásmidos); (ii) inactivación de sus genes por inserción de transposones; (iii) dilución de las células productoras en un medio líquido por debajo de un umbral, e (iv) incubación a temperaturas distintas a las máximas de producción (Diep *et al.*, 1995; Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999; Diep *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Eijsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). En este sentido, se ha descrito la existencia de mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de la producción de algunas bacteriocinas (Kleerebezem y Quadri, 2001; Quadri, 2002), como en el caso de EntA de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998), NisA de distintas cepas de *Lc. lactis* (Kuipers *et al.*, 1995), PltN, PltEF y PltJK de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998), sakacina A (SakA) de *Lactobacillus sakei* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995) y SakP de *Lb. sakei* LTH673 (Eijsink *et al.*, 1996). Así pues, la regulación de la producción de estas bacteriocinas depende de un sistema de transducción de señal, similar a los sistemas que intervienen en la regulación de la respuesta de las células bacterianas a modificaciones ambientales (Diep *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003), que generalmente consta de tres componentes (Fig. 2.10): (i) un péptido inductor (IP, del inglés *Inducing Peptide*), conocido también como factor de inducción, molécula señal o feromona; (ii) una proteína sensora histidín-quinasa (HPK, del inglés *Histidine Protein Kinase*), que funciona como sensor de señales específicas, y (iii) una proteína reguladora de respuesta (RR, del inglés *Response Regulator*), que, tras ser activada por una HPK específica, desencadena la respuesta adaptativa del hospedador (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999; Kleerebezem y Quadri, 2001). En lo que respecta a los genes que codifican estos componentes conviene destacar que pueden constituir un operón independiente (*e.g.*, PltEF y PltJK) o bien formar parte del operón en el que se localizan el gen estructural y/o el de transporte (*e.g.*, CbnB2).

II.3.3.7.4.1. Péptido inductor

Los IP son moléculas de pequeño tamaño molecular, con o sin modificaciones postraduccionales, que constituyen la señal inicial de los sistemas reguladores de tres componentes y que controlan la biosíntesis de determinadas bacteriocinas, permitiendo su producción de manera rápida y “explosiva” mediante un mecanismo de autoinducción (Nes y Eijsink, 1999). Conviene destacar que los IP presentan similitudes estructurales con las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999), ya que: (i) son catiónicos, parcialmente anfipáticos y con capacidad de adoptar una estructura en hélice α , y (ii) se sintetizan en

forma de precursores con una secuencia líder, generalmente del tipo Gly-Gly, lo que sugiere que los IP y bacteriocinas podrían ser procesados y secretados por el mismo transportador del tipo ABC. No obstante, los IP también presentan características que, claramente, los diferencian de las bacteriocinas (Nes y Eijnsink, 1999; Skaugen *et al.*, 2003), como son: (i) su menor tamaño molecular (19–26 aa) con respecto a las bacteriocinas (>30 aa); (ii) la ausencia de actividad antimicrobiana, exceptuando el caso del IP del sistema de las plantaricinas de *Lb. plantarum* C11 (Anderssen *et al.*, 1998) y los casos en los que las bacteriocinas (*e.g.*, NisA) inducen su propia síntesis (Kuipers *et al.*, 1995), y (iii) su elevada potencia, ya que poseen actividad biológica a concentraciones (aprox., 0,1 nM) menores que las requeridas para que las bacteriocinas ejerzan su efecto antimicrobiano (orden picomolar-nanomolar). Por otra parte, existe una homología significativa entre los IP descritos hasta la fecha, si bien, éstos actúan, generalmente, de manera muy específica a nivel de cepa (Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijnsink, 1999). Asimismo, el gen que codifica el IP se cotranscribe generalmente con los genes de las proteínas HPK y RR (Nes y Eijnsink, 1999). Como resultado de la acción del IP se produce tanto la expresión de los genes necesarios para la producción e inmunidad de las bacteriocinas como la autoinducción del sistema de regulación (Nes y Eijnsink, 1999).

II.3.3.7.4.2. Proteína histidín-quinasa y proteína reguladora de respuesta: transducción de señal

Las HPK de los sistemas reguladores contienen tres dominios: (i) un dominio sensor N-terminal, localizado en la cara externa de la membrana citoplasmática, que detecta la presencia del IP; (ii) un dominio central o de membrana, rico en aminoácidos hidrofóbicos que presumiblemente forman 6–8 hélices α transmembrana, y (iii) un dominio C-terminal de unión al ATP (también denominado dominio transmisor), que posee actividad autoquinasa y contiene un residuo de histidina (His) conservado que constituye el lugar de fosforilación (Nes y Eijnsink, 1999). Por otra parte, las RR poseen dos dominios: (i) un dominio N-terminal, que contiene un residuo de ácido aspártico (Asp) conservado que representa el lugar de fosforilación, y (ii) un dominio receptor C-terminal, que media la respuesta adaptativa (Nes *et al.*, 1996).

El mecanismo de inducción de estos sistemas de transducción de señal consiste en una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación acopladas que se desarrollan en cinco etapas (Fig. 2.10): (i) unión del IP al dominio sensor de la HPK; (ii) autofosforilación de la HPK; (iii) desfosforilación de la HPK y fosforilación acoplada del dominio receptor de la proteína RR; (iv) interacción de la proteína RR con secuencias específicas situadas en la región promotora de los genes diana y, por último, (v) activación de la transcripción de los genes implicados en la producción de las bacteriocinas (Nes y Eijnsink, 1999). A este respecto, conviene destacar que la estructura de la región promotora de los genes regulados mediante este sistema es atípica, ya que contiene: (i) una secuencia –10 muy conservada; (ii) una secuencia –35 poco conservada que, por lo tanto, es difícilmente reconocible, y (iii) dos secuencias adicionales características con las que interacciona la proteína RR, denominadas secuencias –80 y –40, que contienen secuencias repetidas directas o inversas de aprox. 10 pb separadas entre sí por una distancia de 12–13 pb (equivalente aproximadamente a dos vueltas en la cadena de ADN) (Diep *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Risøen *et al.*, 1998; Nes y Eijnsink, 1999; Risøen *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se han propuesto dos modelos para explicar el proceso de inducción de la síntesis de bacteriocinas. Según el modelo de regulación por densidad celular (del inglés *Quorum Sensing*), el IP se produce de forma constitutiva en pequeñas cantidades, acumulándose progresivamente durante el crecimiento celular, y cuando se alcanza el nivel umbral requerido para ejercer la autoinducción, se incrementa la expresión de todos los genes de la agrupación génica de la bacteriocina. El modelo alternativo propone que se produce IP a un nivel ligeramente inferior al necesario para la autoinducción, y que la presencia de ciertas condiciones ambientales aumenta transitoriamente su producción, de manera que cuando se supera el nivel umbral se induce su propia síntesis y la del resto de genes de la agrupación génica de la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996; Nes y Eijsink, 1999; Straume *et al.*, 2007).

II.3.3.8. RESISTENCIA ADQUIRIDA

De forma general, la presencia de una sustancia antimicrobiana en un ambiente determinado en el que haya bacterias provoca la selección de variedades bacterianas resistentes a dicha sustancia. En particular, el cultivo de bacterias en presencia de bacteriocinas puede provocar la aparición de mutantes resistentes a las mismas. En este sentido, estudios realizados sobre la respuesta de varias cepas de *L. monocytogenes* a la presencia de PedPA-1 y NisA demostraron que: (i) de forma natural, existen cepas resistentes a cada una de las bacteriocinas; (ii) la influencia de los factores ambientales en la aparición de resistencias es específica de la bacteriocina, ya que las condiciones de estrés ambiental disminuyen la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a NisA, pero no influyen en la aparición de mutantes resistentes a PedPA-1; (iii) la estabilidad del fenotipo de resistencia varía considerablemente, siendo inestable en el caso de NisA, pero estable en el de PedPA-1; (iv) el coste metabólico que supone el fenotipo de resistencia, medido como una reducción en la tasa de crecimiento, también varía, siendo muy evidente en el caso de PedPA-1, y (v) las cepas mutantes resistentes no son más sensibles a las condiciones de estrés ambiental (Gravesen *et al.* 2002a; Chen y Hoover, 2003). No obstante, respecto a esta última característica, conviene mencionar que Modi *et al.* (2000) demostraron que las cepas mutantes resistentes a NisA son más sensibles a los tratamientos térmicos que las cepas salvajes.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencias a las bacteriocinas. En este sentido, la aparición de mutantes de *Listeria* spp. con bajos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa se ha asociado con alteraciones en la composición lipídica, contenido de alanina (Ala) y carga de su membrana citoplasmática (Crandall y Montville, 1998; Vadyvaloo *et al.*, 2002; Vadyvaloo *et al.*, 2004a, b; Drider *et al.*, 2006). Por otra parte, la aparición de mutantes de *L. monocytogenes* y *E. faecalis* con altos niveles de resistencias a bacteriocinas se debe principalmente a la pérdida del sistema PTS manosa-específico (EII^{Man}), codificado por el operón *mptACD*, que podría constituir el receptor de estas bacteriocinas (Dalet *et al.*, 2000, 2001; Hécharde *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002b, 2004; Ramnath *et al.*, 2004). Asimismo, la aparición de mutantes de *L. monocytogenes* con altos niveles de resistencia también es el resultado de la pérdida del factor σ^{54} , codificado por el gen *rpoN* (Robichon *et al.*, 1997), y del activador ManR asociado a σ^{54} (Dalet *et al.*, 2001), ambos implicados en la regulación positiva del operón *mpt* (Xue *et al.*, 2005).

Además, en algún caso, la aparición de mutantes con altos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa se ha asociado a la sobreexpresión del sistema PTS glucósido β -específico (EII^{Bgl}) (Gravesen *et al.*, 2000, 2002b). Por otra parte, Diep *et al.* (2007) han demostrado que la pérdida de dos componentes de EII^{Man} (*ptnC* y *ptnD*) en *Lc. lactis* IL1403, permite a esta cepa desarrollar resistencia frente a LciA debido a que dichos componentes actúan como dianas celulares para LciA, además de para diversas bacteriocinas pertenecientes a la clase II (EntP, LciB, PedPA-1 y SakA) (Diep *et al.*, 2007).

Recientemente, el empleo de la tecnología de *microarrays* de ADN para la caracterización de los mecanismos de resistencia a NisA en *Lc. lactis* ha revelado variaciones en la expresión de 95 genes diferentes pertenecientes a las siguientes categorías funcionales (Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006): (i) síntesis de la pared celular; (ii) metabolismo central y energético; (iii) metabolismo de los fosfolípidos y los ácidos grasos; (iv) regulación génica; (v) transporte; (vi) respuesta a condiciones de estrés, y (vii) otras funciones desconocidas. Entre los genes sobreexpresados en estos mutantes destacan: (i) genes que codifican proteínas de unión a penicilinas; (ii) genes implicados en la síntesis de la pared celular, concretamente en sustituciones en el ácido lipoteicoico, cuya sobreexpresión provoca un incremento de la carga positiva de la pared celular; (iii) genes que codifican transportadores del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1) implicados en la resistencia a determinadas sustancias (*e.g.*, arsénico y bacitracina), y (iv) genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, particularmente en el catabolismo de la arginina, cuya sobreexpresión provoca un incremento de la producción de amonio y, por lo tanto, del pH de la pared celular, lo que podría incrementar su afinidad por NisA, impidiendo su acceso a la membrana citoplasmática. Por otra parte, se observó una reducción de la expresión de los genes implicados en la saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. En definitiva, la resistencia a NisA en *Lc. lactis* y, probablemente, en otras bacterias Gram-positivas, es un rasgo multifactorial en el que están implicados simultáneamente numerosos mecanismos, que parecen ser transitorios ya que este fenotipo (resistencia) desaparece rápidamente cuando las cepas se desarrollan en un medio sin esta bacteriocina (Kok *et al.*, 2005; Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006).

Es conveniente destacar que se ha observado que tras el cultivo de determinadas cepas bacterianas en presencia de algunas bacteriocinas de la clase IIa, en ocasiones, se obtienen mutantes resistentes a esa bacteriocina que también son resistentes a otras bacteriocinas de la misma clase (*e.g.*, PedAcH/BavA, PedAcH/piscicolina 126 [Psc126], PedPA-1/divergicina M35 y leucocinas A [LeuA], B y E/SakA), lo que sugiere la existencia de un posible mecanismo general de resistencia a las bacteriocinas de la clase IIa (Rekhif *et al.*, 1994; Rasch y Knøchel, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Ramnath *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002b; Ramnath *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007). A pesar de que Gravesen *et al.* (2002a) han descrito el desarrollo de resistencia simultánea frente a NisA y PedPA-1 en una cepa de *L. monocytogenes*, y diversos autores han observado la aparición de resistencias cruzadas frente a bacteriocinas de las clases I y II (Crandall y Montville, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Gravesen *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007), en general, mutantes resistentes a bacteriocinas de la clase IIa no son resistentes a los lantibióticos ni a otras bacteriocinas pertenecientes a otras clases (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Rasch y Knøchel, 1998; Guinane *et al.*, 2006). Sin embargo, dado que uno de los problemas que plantea el empleo de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios es la aparición

de poblaciones resistentes, el empleo de combinaciones de bacteriocinas con una potente actividad antimicrobiana y con diferentes mecanismos de acción, en un sistema de barreras múltiples (sección II.3.3.10.1.1), podría evitar la aparición y el desarrollo de resistencias bacterianas (Cintas *et al.*, 2000b; Cotter *et al.*, 2005b).

II.3.3.9. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos: (i) pruebas biológicas, basadas en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos sensibles (microorganismos indicadores); (ii) pruebas genéticas, basadas en la detección de secuencias específicas de genes estructurales de bacteriocinas ya caracterizadas, y (iii) pruebas inmunoquímicas, basadas en la detección de bacteriocinas mediante el empleo de anticuerpos específicos (Martínez *et al.*, 2000c). Además, existen otras pruebas para la detección y/o cuantificación de bacteriocinas, aunque su empleo está menos generalizado, basadas en fenómenos físico-químicos como la: (i) conductancia (Giraffa *et al.*, 1990); (ii) quimioluminiscencia/fluorimetría (Wahlström y Saris, 1999); (iii) bioluminiscencia (Reid *et al.*, 1990), y (iv) espectrometría de masas (Rose *et al.*, 1999; Zendo *et al.*, 2007).

II.3.3.9.1. Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen habitualmente el punto de partida en la búsqueda de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar (ADT, del inglés *Agar Diffusion Test*) (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995) y los métodos turbidométricos como la prueba en placas microtituladoras (MPA, del inglés *Microtiter Plate Assay*) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d) basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa de agar o en caldo en una placa microtituladora, respectivamente. La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando “unidades arbitrarias” (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, o “unidades de bacteriocina” (UB) cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la máxima dilución de la muestra analizada que: (i) inhibe al microorganismo indicador inoculado en la placa de agar produciendo la aparición de un halo o zona de inhibición del indicador (expresado en UA), o (ii) inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora con respecto a un control sin bacteriocina (expresado en UB). En este contexto, la ausencia de unidades internacionales de actividad para las bacteriocinas, salvo en el caso de NisA, impide no sólo estandarizar los métodos biológicos de análisis de las mismas, sino también la comparación directa de la sensibilidad de diferentes especies y cepas. No obstante, a pesar de su innegable utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan tres inconvenientes que las convierten en poco reproducibles y fiables: (i) la cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora; (ii) son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana, y (iii) el crecimiento del microorganismo indicador está influido por diversos

factores (*e.g.*, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación) (Blom *et al.*, 1997; Martínez, 2000).

II.3.3.9.2. Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) o de hibridación ADN-ADN, (*Southern-blot*, *dot-blot* e hibridación en colonia) son pruebas genéticas de empleo rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de producir una determinada bacteriocina, mediante la detección específica y rápida de sus genes estructurales y/o secuencias específicas del operón correspondiente (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad. No obstante, la detección de la presencia del gen estructural de una bacteriocina en una cepa no implica la producción y liberación al medio extracelular de las bacteriocinas correspondientes, ya que en algunos casos pueden constituir genes silentes que no se transcriben o que sólo se expresan bajo determinadas condiciones ambientales (de Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Citti, 2005). Además, en el caso de la reacción de PCR, no es posible discriminar entre variantes de una misma bacteriocina que difieran en tan sólo unos nucleótidos, por lo que siempre es conveniente obtener la secuencia nucleotídica de los amplicones obtenidos (Martínez, 2000).

II.3.3.9.3. Pruebas inmunoquímicas

Las pruebas inmunoquímicas constituyen el método de elección para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte, para que, una vez fijado a la misma, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico, y posteriormente detectado enzimáticamente. La obtención de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas permitiría la detección y cuantificación de bacteriocinas en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran. Además, dichos ensayos pueden servir de referencia para el desarrollo de otras pruebas inmunológicas más complejas, como por ejemplo, las de inmunolocalización e inmunopurificación (Gutiérrez, 2005). No obstante, la utilización de técnicas inmunoquímicas ha tenido un impacto marginal en la detección y cuantificación específica de bacteriocinas en comparación con la detección y cuantificación de otros péptidos y proteínas. Esto puede ser debido a la dificultad de generar anticuerpos específicos frente a las bacteriocinas de interés derivada de: (i) el pequeño tamaño de las bacteriocinas, generalmente inferior a 5–10 kDa, lo que las convierte en haptenos, es decir, en sustancias antigénicas reconocidas por anticuerpos específicos pero no inmunógenas o capaces de generar una respuesta inmune; (ii) la ausencia de aminoácidos modificados, excepto en el caso de los lantibióticos, y/o de plegamientos estructurales complejos, lo que también contribuye a su escasa o nula inmunogenicidad; (iii) la necesidad de cantidades suficientes de bacteriocina purificada para su empleo durante el proceso de inmunización; (iv) la ausencia de preparados comerciales de bacteriocinas de gran pureza, y (v) la escasez de métodos de purificación con rendimientos adecuados (Martínez, 2000).

Por otra parte, en función del tipo de muestra utilizada para la detección de la bacteriocina, las técnicas inmunoenzimáticas se dividen en dos grandes grupos: (i) ensayos basados en la transferencia de células para su posterior reconocimiento inmunoquímico (*colony-immunoblot*), y (ii) ensayos basados en la transferencia de sobrenadantes de cepas bacteriocinogénicas o de bacteriocinas (semi-) purificadas para su posterior detección inmunoquímica. Dentro del segundo grupo, existen distintos ensayos según la superficie inerte en la que se fijan los antígenos y el tipo de transferencia: (i) *Western-blot*, basado en la transferencia electroforética de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *Polyvinylidene difluoride*); (ii) *spot-immunoblot*, basado en la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa, y (iii) ELISA (del inglés *Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay*), basado en la transferencia directa de las bacteriocinas a placas o paletas de poliestireno o polietileno (Gutiérrez, 2005; Criado, 2006).

El empleo de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas en pruebas inmunoquímicas que permitan su detección y/o cuantificación requiere previamente: (i) la elección del inmunógeno (molécula con capacidad de provocar una respuesta inmune y reaccionar con anticuerpos específicos) que se empleará durante el protocolo de inmunización y frente al que se generarán los anticuerpos; (ii) la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a bacteriocinas en animales de experimentación; (iii) la evaluación de la sensibilidad y especificidad de los inmunoseros obtenidos, y (iv) el desarrollo de protocolos eficaces para la detección y cuantificación de las bacteriocinas (Criado, 2006).

II.3.3.9.3.1. Aplicación de anticuerpos frente a bacteriocinas

De forma general, la principal aplicación de los anticuerpos generados frente a bacteriocinas ha sido facilitar su detección y cuantificación en los sobrenadantes de cepas bacteriocinogénicas o en muestras obtenidas durante su purificación a homogeneidad y, sólo en pocas ocasiones, en sustratos alimentarios reales (Stringer *et al.*, 1995; Suárez *et al.*, 1996b; Bouksaim *et al.*, 1999, 2000; Daoudi *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002; Criado *et al.*, 2006b; Sánchez *et al.*, 2008; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). No obstante, el potencial de aplicación de estos anticuerpos es muy amplio, incluyendo:

1. El estudio de la regulación de la producción de bacteriocinas y de la relación estructura-función (Suárez *et al.*, 1996a, b; Horn *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998, 1999; Daoudi *et al.*, 2001; Kawamoto *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002; Keren *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b).
2. La determinación de la producción de múltiples bacteriocinas por hospedadores heterólogos (Horn *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000b; Criado, 2006; Basanta, 2007; Borrero, 2012).
3. La inmunolocalización de las bacteriocinas en células productoras, células sensibles y sustratos en los que desarrollan su actividad (Maqueda *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1995; Bouksaim *et al.*, 1999; Benech *et al.*, 2002b). Esta técnica requiere la disponibilidad de anticuerpos específicos marcados (*e.g.*, con partículas de oro) que permitan la visualización mediante microscopía electrónica de los complejos antígeno-anticuerpo y resulta útil no sólo para facilitar el estudio de la biosíntesis de las bacteriocinas y de su mecanismo de acción (Bouksaim *et al.*, 1999, 2000; Benech *et al.*, 2002b), sino

también para la determinación *in situ* de la presencia, en forma libre o unida a los constituyentes de los alimentos, de las moléculas de bacteriocinas (Stringer *et al.*, 1995).

4. La inmunopurificación de bacteriocinas (Suárez *et al.*, 1997; Prioult *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2001; Benech *et al.*, 2002b; Gutiérrez *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2004). Esta técnica, basada en la inmovilización de los anticuerpos específicos en soportes adecuados (resinas cromatográficas o partículas magnéticas), ha resultado eficaz para la purificación a homogeneidad de bacteriocinas (en una única etapa).

II.3.3.10. APLICACIONES DE LAS BACTERIOCINAS

II.3.3.10.1. Industria alimentaria

Hasta la fecha, se han propuesto múltiples aplicaciones de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas en los alimentos (Hugas, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Ryan *et al.*, 2002; Chen y Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Guinane *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Settanni y Corsetti, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Bakkal *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012) derivadas de su eficacia para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos, principalmente bacterias alterantes y patógenas (O'Sullivan *et al.*, 2002a; Työppönen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). De estas aplicaciones, destaca su empleo en la bioconservación de alimentos para: (i) mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y extender su vida útil, debido a la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos (*e.g.*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y/o alterantes presentes en diversos alimentos (*e.g.*, quesos, embutidos, yogur, vegetales y bebidas) (McAuliffe *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006; Settanni y Corsetti, 2008; El Bassi *et al.*, 2009), y (ii) mejorar la calidad y características organolépticas de diversos alimentos (*e.g.*, quesos y vinos), mediante el control de la microbiota láctica que no forma parte del cultivo iniciador (NSLAB, del inglés *Non-Starter Lactic Acid Bacteria*) (Ryan *et al.*, 1996, 2001; Deegan *et al.*, 2006). Por otra parte, conviene destacar el potencial de diversas bacteriocinas sin efecto bioconservante (*e.g.*, lactococcinas A, B y M [LciA, LciB y LciM], lacticina 3147 [Ltn3147], lacticina 481 [Ltn481] y enterocina AS-48 [EntAS-48]) en la mejora de las características organolépticas de los quesos, debido a la lisis de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, que provoca la liberación de sus enzimas intracelulares y, por lo tanto, la aceleración de su maduración (Ross *et al.*, 1999; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Oumer *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002b; Peláez y Requena, 2005).

II.3.3.10.1.1. Bioconservación de alimentos

La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos disponibles actualmente en la industria alimentaria se basan en complejos procesos tecnológicos y en el empleo de aditivos químicos. Sin embargo, cada vez es mayor el número de consumidores que demandan productos “más naturales”, menos procesados e, incluso, libres de aditivos químicos. En este contexto, la bioconservación es una alternativa que permite garantizar la seguridad de estos alimentos y, por lo tanto, satisfacer la demanda

de los consumidores actuales. En este sentido, la bioconservación se define como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad y la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales sobre la salud de los consumidores” (Stiles, 1996; Cintas y Casaús, 1998) o incluso como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de la microbiota natural o sus metabolitos” (Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 2002). Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos como bioconservantes para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos patógenos y alterantes presentes en diversos alimentos (*e.g.*, leche, quesos, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales, pescados, mariscos, ensaladas, alimentos enlatados, ovoproductos, vino, cerveza, bebidas analcohólicas y productos de panadería) (Daeschel, 1993; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Työppönen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2004a; Cotter *et al.*, 2005b; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2010). Por consiguiente, el empleo de bacterias lácticas y/o sus metabolitos como bioconservantes alimentarios, formando parte de un sistema de barreras múltiples, constituye una alternativa, fácilmente aceptable por los consumidores, las agencias sanitarias y empresas alimentarias, que permitiría obtener productos más naturales, más saludables y con menos aditivos químicos (Stiles, 1996; Cintas y Casaús, 1998; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Ross *et al.*, 2002; Vermeiren *et al.*, 2004; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008).

Conviene destacar que de los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas (sección II.2.2), las bacteriocinas producidas por microorganismos de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* poseen un gran potencial como bioconservantes en la industria alimentaria (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998; Cotter *et al.*, 2005b; Gálvez *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2010), lo que es debido a algunas de sus características, entre las que se incluyen:

1. Su producción por bacterias que, debido a la larga tradición de su empleo en alimentos fermentados sin problemas higiénico-sanitarios asociados, son consideradas microorganismos GRAS y/o QPS (Schillinger *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2000d) (sección II.2.3).
2. Naturaleza proteica (sección II.3.3.2), por lo que se inactivarían por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo (principalmente gástricas) (Piard y Desmazeaud, 1991; Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b; Bernbom *et al.*, 2006) y, por lo tanto, no originarían disbiosis intestinales.
3. Ausencia de capacidad inmunógena (sección II.3.3.9.3), por lo que no ocasionarían fenómenos alérgicos.
4. Amplio espectro de acción antimicrobiana y potente actividad frente a microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en diversos alimentos, como *L. monocytogenes*, *St. aureus* y *Cl. botulinum* (sección II.3.3.3). Además, pueden actuar sinérgicamente con otros sistemas de conservación de los alimentos (Gould, 1996).

5. Resistencia a diversos tratamientos tecnológicos de conservación aplicados a los alimentos (e.g., pasteurización, liofilización y acidificación).
6. Ausencia de actividad biológica frente a células eucariotas.

De forma general, existen cuatro estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la bacteriocina *in situ* como cultivo protector y/o cultivo iniciador; (ii) adición de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica como ingrediente alimentario; (iii) adición de la bacteriocina parcialmente purificada o purificada a homogeneidad como aditivo alimentario, e (iv) incorporación o inmovilización de la bacteriocina en el material de envasado de los alimentos con el fin de desarrollar un envase activo (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 1999; Chikindas y Montville, 2002; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007; Gálvez *et al.*, 2007; Blanco-Massani *et al.*, 2008, 2012). Prácticamente cualquier bacteria láctica bacteriocinogénica y/o bacteriocina puede emplearse en la industria alimentaria bajo las dos primeras formas de aplicación; de hecho, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se han utilizado de forma empírica o inadvertida durante siglos en las fermentaciones alimentarias (Stiles, 1996). En lo que se refiere a la tercera estrategia, el empleo de bacteriocinas como aditivos alimentarios está sujeto a la regulación de la lista positiva de estas sustancias y, en la actualidad, la única bacteriocina autorizada para tal fin es NisA, en determinados tipos de productos. A este respecto, en la UE está permitida la utilización de NisA como conservante (E-234) en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres. Asimismo, en Australia y Nueva Zelanda también está permitida su utilización como conservante de la cerveza (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Riley y Wertz, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Delves-Broughton, 2005). En este contexto, para que se acepte legalmente el empleo de una bacteriocina como aditivo alimentario se requieren numerosos estudios bioquímicos, genéticos y toxicológicos, que suponen un coste económico muy importante (Schoeman *et al.*, 1999; Deegan *et al.*, 2006), lo que provoca que su empleo como bioconservante se realice mediante cualquiera de las otras estrategias. Así pues, actualmente, se comercializan diversos medios fermentados por cepas bacteriocinogénicas como ingredientes alimentarios, tal es el caso del medio ALTA 2341TM (fermentado por *P. acidilactici*) (Daeschel, 1989; Cotter *et al.*, 2005b). Asimismo, la producción *in situ* de bacteriocinas representa una alternativa muy interesante desde el punto de vista económico, ya que no lleva asociado el coste adicional necesario para su empleo como aditivo alimentario y, además, proporciona una fuente de bacteriocina más duradera (McMullen y Stiles, 1996; Benkerroum *et al.*, 2002). En lo que respecta al desarrollo de envases activos, recientemente, Blanco-Massani *et al.* (2008, 2012) han llevado a cabo estudios de incorporación o inmovilización de bacteriocinas, como lactocina 705 (Lac705 [Lac705 α y Lac705 β]) y NisA, en *films* de polietileno y han estudiado cómo se comportan estos envases en distintos tipos de almacenamiento, así como la transferencia de la bacteriocina del envase al alimento, concluyendo que este tipo de envases presenta un gran potencial para su aplicación en la conservación de alimentos.

Hasta la fecha, NisA y PedPA-1 son las bacteriocinas de las bacterias lácticas que han tenido mayor aceptación comercial para su empleo como bioconservantes alimentarios; no obstante, otras bacteriocinas han mostrado resultados prometedores tanto a nivel industrial como en ensayos de laboratorio (Diep y Nes, 2002). En este sentido, el empleo de las bacterias lácticas en los productos lácteos ha tenido una larga y segura trayectoria, principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración del queso (O'Sullivan *et al.*, 2002a). En la industria láctea se utilizan frecuentemente los nitratos para prevenir la germinación de los esporos de microorganismos del género *Clostridium*, lo que constituye un problema frecuente durante la producción de quesos debido a la producción de toxina botulínica por *Cl. botulinum* o a la sobreproducción de ácido butírico por *Clostridium tyrobutyricum* (Schillinger *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001). No obstante, la problemática higiénico-sanitaria asociada a la utilización de estos conservantes químicos puede evitarse mediante el empleo de NisA, como se ha descrito para la elaboración de queso Gouda, Camembert, Cheddar y Cottage (Benkerroum y Sandine, 1988; Hugenholtz y de Veer, 1991; Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Zottola *et al.*, 1994; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Además, NisA posee un amplio y potente espectro antimicrobiano, en el que se incluyen microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos como *L. monocytogenes* y *Cl. botulinum* (Schillinger *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001). Por ello, en la actualidad se utiliza como bioconservante de una gran variedad de productos lácteos (*e.g.*, quesos procesados y para untar, quesos acidificados, postres lácteos pasteurizados, leche fresca pasteurizada y sus mezclas), así como de huevo líquido (Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Benech *et al.*, 2002a, b; Twomey *et al.*, 2002; Garneau *et al.*, 2003). Por otra parte, un gran número de bacteriocinas distintas de NisA podrían emplearse como bioconservantes de los productos lácteos, entre las que destacan las siguientes: (i) Ltn3147, que inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* Scott A y *B. cereus* en queso Cottage, quesos madurados con mohos, yogur natural y leche de bebés (McAuliffe *et al.*, 1999; Papagianni, 2003; Deegan *et al.*, 2006). Asimismo, Ltn3147 y lacticina 99 permiten mejorar la calidad y características organolépticas de los quesos mediante el control de la microbiota láctica que no forma parte del cultivo iniciador (NSLAB) (Ryan *et al.*, 1996; Fenelon *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006); (ii) PedPA-1, producida heterológicamente por cepas de *Lc. lactis* y *Lb. plantarum*, empleada en la elaboración de queso Cheddar y como espray sobre la superficie de queso Munster por su efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* (Buyong *et al.*, 1998; Ennahar *et al.*, 1998); (iii) la pediocina 5, que inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en leche (Huang *et al.*, 1994); (iv) la cepa *E. faecium* F58, productora de la enterocina F58, que reduce el crecimiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 serovar 4b en 1–4 unidades logarítmicas cuando son cocultivadas en leche de cabra y, además, inhibe el desarrollo de esta cepa en los quesos Jben (Achemchem *et al.*, 2006); (v) Psc126, producida por *Carnobacterium maltaromaticum* JG126, que inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos Camembert (Wan *et al.*, 1997); (vi) la linocina M-18, producida por *Brevibacterium linens*, que inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos rojos (Eppert *et al.*, 1997); (vii) la variacina, producida por *Kocuria varians*, empleada en la producción de productos lácteos refrigerados y postres de vainilla y chocolate por su efecto inhibitorio sobre *B. cereus* (O'Mahony *et al.*, 2001), y (viii) EntA, EntP y EntAS-48, producidas por cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, que inhiben el desarrollo de *L. monocytogenes* durante la elaboración de los quesos Cottage, Feta, Manchego, Taleggio

y Cheddar (Giraffa *et al.*, 1995; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2008). Asimismo, EntA, producida por *E. faecium* CCM 4231, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* y *St. aureus* en leche de soja (Lauková y Czikková, 1998). Por otra parte, LciA, LciB, LciM, Ltn 3147, Ltn481 y EntAS-48 presentan un efecto lítico sobre las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores del queso Cheddar, produciendo una disminución del tiempo de maduración y afectando positivamente a su calidad y a sus características organolépticas (Crow *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1999; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Oumer *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002b; Peláez y Requena, 2005).

En lo que respecta a la bioconservación de la carne fresca y los productos cárnicos fermentados, la utilización de NisA ha sido ampliamente estudiada, si bien se ha observado su ineficacia debido a su unión a grupos sulfhidrilo de las proteínas o a partículas de grasa (Chung *et al.*, 1989; Deegan *et al.*, 2006; Fontana *et al.*, 2012) y a su fuerte interacción con los fosfolípidos, lo que principalmente limita su actividad en carnes con un alto contenido de grasas (Henning *et al.*, 1986). No obstante, el empleo de NisA ha resultado ser efectiva en: (i) salchichas del tipo Bolonia, con un contenido reducido de grasa (Davies *et al.*, 1999); (ii) carne de ternera, para inhibir el desarrollo de *Br. thermosphacta* (Cutter y Siragusa, 1998), y (iii) jamón, para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* (Jofré *et al.*, 2007). En la industria cárnica se utilizan frecuentemente los nitritos para estabilizar el color rojo de las carnes y para prevenir la germinación de las esporas de microorganismos del género *Clostridium*. Sin embargo, estos aditivos pueden reaccionar con aminas secundarias en las carnes, formándose nitrosaminas carcinogénicas (Chen y Hoover, 2003). Esta problemática higiénico-sanitaria puede evitarse mediante el empleo de una menor dosis de nitritos en combinación con NisA, lo que resulta en la inhibición de la formación de esporas de *Clostridium sporogenes* y el retraso en la producción de toxina botulínica por *Cl. botulinum* (Rayman *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1985). Por otra parte, diversos estudios han puesto de manifiesto que las bacteriocinas producidas por microorganismos de los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* y *Lactobacillus*, entre otros, poseen un mayor potencial como bioconservantes de los productos cárnicos que NisA (Stiles y Hastings, 1991; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Fontana *et al.*, 2012). A este respecto, la incorporación de cepas de *P. acidilactici* productoras de PedPA-1 en salchichas tipo Frankfurter de pavo o pollo y en embutidos fermentados permite inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* (Berry *et al.*, 1991; Foegeding *et al.*, 1992; Luchansky *et al.*, 1992; Baccus-Taylor *et al.*, 1993). Asimismo, el empleo combinado de PedPA-1 y el envasado en atmósferas modificadas permite reducir la incidencia de alteraciones de la carne producidas por bacterias Gram-negativas (Stiles y Hastings, 1991). Por otra parte, la incorporación de LeuA, producida por *Leuconostoc gelidum* UAL 187, en carne de ternera picada y envasada al vacío permite retrasar durante 6–8 semanas la alteración producida por *Lb. sakei* (Leisner *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado la eficacia de la utilización de EntA, EntB, EntAS-48, EntCRL35 y enterocina 416K1 (Ent416K1), SakA, SakK, SakP y SakX, Lac705 (Lac705 α y Lac705 β), leucocina 4010 (Leu4010), Psc126 y plantaricina 423 (Plt423), entre otras bacteriocinas, para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en pechugas de pollo, jamón, cerdo y pato, carne de ternera y avestruz, salchichas y embutidos fermentados (Schillinger, *et al.*, 1991; Holck, *et al.*, 1994a, b; Tichaczek *et al.*, 1994; Jack *et al.*, 1996; Vignolo *et al.*, 1996; Hugas *et al.*, 1998; Lauková *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2000a, c; Callewaert *et al.*, 2000; Vignolo *et al.*, 2000;

Hugas *et al.*, 2003; Dicks *et al.*, 2004; Ananou *et al.*, 2005; Benkerroum *et al.*, 2005; Castellano y Vignolo, 2006; Héquet *et al.*, 2007; Jofré *et al.*, 2007; Castellano *et al.*, 2010). Finalmente, el empleo de cepas productoras de bacteriocinas (e.g., Ltn3147 y curvacina A [CurA]) como adjuntos del cultivo iniciador ha permitido mejorar las características organolépticas de productos cárnicos como el salami y embutidos fermentados (Vogel *et al.*, 1993; Coffey *et al.*, 1998).

Por otra parte, el deterioro del pescado fresco es causado normalmente por microorganismos Gram-negativos que, de forma general, no son sensibles a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, por lo que muy pocos investigadores han evaluado su eficacia como bioconservantes de estos productos (O'Sullivan *et al.*, 2002a; Calo-Mata *et al.*, 2008; Leroi, 2010); sin embargo, en el pescado envasado al vacío, microorganismos Gram-positivos como, entre otros, *Cl. botulinum* y *L. monocytogenes* pueden causar graves problemas sanitarios, habiéndose descrito su inhibición por diversas bacteriocinas (Degnan *et al.*, 1994; Einarsson y Lauzon, 1995; Nilsson *et al.*, 1997; Brillet *et al.*, 2005; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Tomé *et al.*, 2008, Tahiri *et al.*, 2009). A este respecto, algunos investigadores han evaluado la eficacia de la adición de cultivos bacteriocinogénicos en estos productos. Así pues, se ha descrito el crecimiento y la producción de bacteriocinas por *Carnobacterium divergens* V41, *C. piscicola* VI, *C. piscicola* SF668, *C. piscicola* A9b y *C. piscicola* CS256 en pescado ahumado conservado a 4 y 5°C, lo que permitió inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* en este producto (Duffes *et al.*, 1999a, b; Nilsson *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2003; Brillet *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2004). Asimismo, Connil *et al.* (2002) demostraron el potencial de *C. divergens* V41, microorganismo productor de divercina V41, como bioconservante del salmón ahumado refrigerado a diferentes temperaturas y concentraciones de glucosa y sal. Además, Katla *et al.* (2001) y Aasen *et al.* (2003) describieron la eficacia de SakP para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado. Por último, se ha comprobado la eficacia de NisA para la conservación de filetes de pescado ahumado y de NisZ y BavA, producida por *Lactobacillus bavaricus* MI 401, para la conservación de camarones (Einarsson y Lauzon, 1995).

En lo que respecta a la bioconservación de productos vegetales y frutas, Plinio “El Viejo” describía en el siglo I d.C. la conservación de la col blanca en vasijas de barro especiales, empleadas sucesiva y únicamente para este fin; no existe duda de que, bajo las condiciones descritas por Plinio, la col se fermentaba a *sauerkraut* por la acción de los microorganismos que quedaban retenidos en los poros de las vasijas y que procedían de una fermentación anterior (Cintas y Casaus, 1998; Park y Kim, 2012). Durante esta fermentación, llevada a cabo por *Leuconostoc mesenteroides*, se produce dióxido de carbono y ácidos orgánicos que inhiben el desarrollo de la mayoría de los microorganismos indeseables debido a las condiciones anaeróbicas y al descenso de pH. A pesar de ello, se puede producir el desarrollo de cepas de *Lb. plantarum* que alteran este producto; no obstante, se ha demostrado que el empleo de NisA y cepas de *Le. mesenteroides* resistentes a esta bacteriocina permiten que se desarrolle esta fermentación y se produzca la inhibición de las cepas alterantes de *Lb. plantarum* (Harris *et al.*, 1992a, b; Settanni y Corsetti, 2008). En la actualidad, la manipulación y el sistema de envasado que requieren los productos de origen vegetal dificultan a veces el mantenimiento de temperaturas de refrigeración adecuadas, lo que proporciona un ambiente propicio para el crecimiento de

microorganismos patógenos. Por ello, se ha evaluado el empleo de cultivos de cepas productoras de bacteriocinas como una barrera antimicrobiana adicional en este tipo de alimentos (O'Sullivan *et al.*, 2002a; Park y Kim, 2012). A este respecto, Cai *et al.* (1997) demostraron que el cocultivo de *Lc. lactis* HPB1688, productor de NisZ, con *L. monocytogenes* en los envases de ensalada fresca cortada y lista para su consumo permitía reducir aproximadamente 10 veces la población de este patógeno después del almacenamiento del producto entre 7–10°C durante 10 días. Este mismo grupo demostró que una enterocina producida por una cepa de *E. faecium* era capaz de reducir la población de *L. monocytogenes* en ensalada Caesar. En otro estudio, Allende *et al.* (2007) demostraron que la aplicación de NisZ y coagulina, independiente y conjuntamente en una solución de lavado, permite inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en ensalada fresca y cortada. Por otra parte, la munditicina AT06, producida por *E. mundtii* AT06, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en brotes de soja (Bennik *et al.*, 1998; Settanni y Corsetti, 2008). Conviene destacar que otro problema asociado a los vegetales frescos es la posibilidad de que vehiculen una contaminación bacteriana con coliformes o enterococos como resultado de unas inadecuadas condiciones higiénicas durante su manipulación. A este respecto, Vescovo *et al.* (1995) demostraron que al tercer día de la inoculación de cepas de *Lb. casei* en vegetales refrigerados envasados y listos para su consumo se observaba un marcado efecto inhibidor de estos microorganismos, lo que permitió reducir drásticamente o eliminar la presencia de coliformes o enterococos, respectivamente, en el producto. Por otra parte, Ruiz-Barba *et al.* (1994) y de Castro *et al.* (2002) demostraron que la utilización como cultivos iniciadores de *Lb. plantarum* LPCO10 (productor de PltS y PltT) y *Enterococcus casseliflavus* cc45 (en combinación con *Lactobacillus pentosus* CECT 5138), permite controlar la fermentación de aceitunas verdes de estilo español. Asimismo, Komitopoulou *et al.* (1999) y Grande *et al.* (2005) demostraron que NisA y EntAS-48, respectivamente, son efectivas para controlar las alteraciones organolépticas producidas por *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas. Además, EntAS-48 inhibe el crecimiento de: (i) *B. licheniformis* en zumo de manzana y sidra (Grande *et al.*, 2006b); (ii) *B. cereus* en alimentos a base de arroz y puré de verduras (Grande *et al.*, 2006a, 2007b); (iii) *Bacillus coagulans* en frutas y productos vegetales enlatados (Lucas *et al.*, 2006), y (iv) *St. aureus* en salsas vegetales (Grande *et al.*, 2007a; Settanni y Corsetti, 2008). Finalmente, EntEJ97 producida por *E. faecalis* EJ97 inhibe el crecimiento de *Bacillus macroides* y *Bacillus maroccanus* en purés de verduras (Settanni y Corsetti, 2008).

Finalmente, los estudios realizados sobre la posible utilidad de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes de la cerveza son muy escasos y se han basado principalmente en el empleo de NisA. A este respecto, se ha demostrado la eficacia de esta bacteriocina para inhibir las alteraciones microbianas producidas por las bacterias lácticas en la cerveza (Delves-Broughton *et al.*, 1996) y en el vino (Daeschel *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 2000; Rojo-Bezares *et al.*, 2007a). Estos estudios demuestran que las bacterias lácticas alterantes de estas bebidas alcohólicas son sensibles a NisA pero, sin embargo, la actividad biológica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las características organolépticas de los productos finales no se ven afectadas. De este modo, NisA podría emplearse en la industria cervecera para: (i) prevenir y/o controlar posibles contaminaciones durante el proceso de fermentación; (ii) eliminar posibles contaminaciones bacterianas durante los lavados de la

levadura; (iii) reducir los tiempos de pasteurización, y/o (iv) aumentar la vida media de cervezas no pasteurizadas (Delves-Broughton *et al.*, 1996). En este contexto, como se mencionó anteriormente, el empleo de NisA como aditivo antimicrobiano en cerveza sólo está autorizado en Australia y Nueva Zelanda (Delves-Broughton *et al.*, 1996). De forma similar, NisA puede aplicarse en la industria del vino; no obstante, no podría utilizarse en los vinos en los que la fermentación maloláctica determina sus características organolépticas, salvo que se empleen cepas de bacterias lácticas resistentes a NisA y capaces de desarrollar esta fermentación (Daeschel *et al.*, 1991; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Además, Chihib *et al.* (1999) demostraron que NisA, en combinación con otros factores de estrés microbiano (*e.g.*, temperatura y pH), inhibe el desarrollo de *Pectinatus frisingensis*, una bacteria Gram-negativa anaerobia alterante de la cerveza. Asimismo, se ha descrito el aislamiento de malta y sorgo de cepas bacteriocinogénicas de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* que poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de las principales bacterias lácticas alterantes de la cerveza (O'Mahony *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2001; Hartnett *et al.*, 2002). Además, se han purificado a homogeneidad 11 de estas bacteriocinas lo que ha resultado en el reconocimiento de que todas ellas pertenecen a la clase II, siendo algunas bacteriocinas nuevas (*e.g.*, SakX y SakT) y, la mayoría, idénticas a otras ya descritas aisladas de sustratos diferentes como SakP, LeuA y MesY105. Por otra parte, se ha descrito el aislamiento de cerveza alterada de la cepa bacteriocinogénica *Lb. plantarum* 423, así como la purificación y caracterización de la bacteriocina responsable de su actividad antimicrobiana (Plt423) (van Reenen *et al.*, 1998). En un estudio reciente, Vaughan *et al.* (2004a) demostraron que la cepa *Lc. lactis* M30, aislada de cebada, produce y secreta una bacteriocina, idéntica a Ltn3147 (Settanni *et al.*, 2005), en mosto cervecero. Asimismo, esta bacteriocina, inoculada en cerveza, inhibe el desarrollo de la cepa alterante de cerveza *Lb. brevis* BSH9 y, además, permanece biológicamente activa tras someterse a los tratamientos térmicos de pasteurización de la cerveza y almacenamiento a 30°C y refrigeración; no obstante, pierde su actividad antimicrobiana después de 12 h de fermentación y cuando se adiciona y somete a ebullición en mosto con lúpulo. Por otra parte, Navarro *et al.* (2000) aislaron, de productos vinícolas y vino, nueve cepas de *Lb. plantarum* con actividad bacteriocinogénica frente a otras bacterias lácticas, entre las que *Lb. plantarum* J23 y J51 fueron las cepas con mayor actividad antimicrobiana. Además, *Lb. plantarum* J23 sólo mostró actividad antimicrobiana frente a cepas de *Oenococcus oeni* y cepas de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*, cuando se cocultivó con otras bacterias lácticas (Rojo-Bezares *et al.*, 2007b). Por otra parte, Schoeman *et al.* (1999) propusieron la construcción de cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* con la capacidad de producir bacteriocinas de interés para la bioconservación de la cerveza, el vino y los productos de panadería durante el proceso de fermentación. En este sentido, PedPA-1 y Plt423 se han expresado heterológamente en cepas de *Sc. cerevisiae* (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003). Recientemente, Basanta (2007) evaluó exitosamente la aplicación potencial de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* L50 como bioconservantes de la cerveza en los diversos procesos de elaboración para inhibir el desarrollo de bacterias lácticas alterantes de este producto. Asimismo, describió la obtención y funcionalidad de cepas recombinantes de levaduras, *Sc. cerevisiae* y *Pichia pastoris* con la capacidad de expresar y secretar heterológamente EntL50 (EntL50A y EntL50B) como estrategia de bioconservación de la cerveza (Basanta, 2007).

A pesar del potencial práctico de las bacteriocinas de las bacterias lácticas descrito anteriormente, la eficacia de estas sustancias y/o de las cepas bacteriocinogénicas en aplicaciones industriales puede resultar alterada por diversos factores que afectan a la capacidad bacteriocinogénica de las cepas empleadas y/o a la actividad antimicrobiana de sus bacteriocinas (Nettles y Barefoot, 1993; Daeschel, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996; Callewaert *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000d; Aasen *et al.*, 2003; Bhatti *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2007). A este respecto, entre los factores que afectan desfavorablemente a la capacidad bacteriocinogénica destacan: (i) la existencia de un ambiente inadecuado (*e.g.*, pH, temperatura y nutrientes) para la síntesis de bacteriocinas en cantidad suficiente; (ii) la presencia de fagos que destruyan o retrasen el crecimiento de las cepas bacteriocinogénicas; (iii) la pérdida espontánea de tal capacidad (sólo cuando sus determinantes genéticos se localizan en plásmidos u otros elementos genéticos transmisibles), y (iv) la incapacidad de la cepa bacteriocinogénica de desarrollarse debido a fenómenos de antagonismo ejercidos por otros microorganismos presentes en el alimento. Por otra parte, entre los factores que influyen negativamente en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas destacan: (i) la aparición de microorganismos resistentes; (ii) la existencia en el alimento de condiciones (*e.g.*, pH, proteasas, procesos oxidativos y aditivos alimentarios) que alteren su estructura y/o función; (iii) su unión a ciertos componentes de los alimentos (*e.g.*, proteínas y partículas de grasa), y (iv) la dificultad para lograr su solubilización y/o distribución uniforme en la matriz alimentaria, especialmente en los alimentos elaborados con materias primas sólidas o semisólidas. No obstante, las bacteriocinas pueden actuar sinérgicamente con otros métodos de conservación y/o compuestos antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria, entre los que se incluyen: (i) el acetato y lactato de sodio y el sorbato de potasio, que aumentan la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (*e.g.*, NisA, PedPA-1 y Ltn3147) frente a *L. monocytogenes*, *Cl. perfringens* y *S. enterica* en diversos productos cárnicos (Scannell *et al.*, 2000a; Uhart *et al.*, 2004; Bari *et al.*, 2005); (ii) el ácido cítrico, fítico y láctico, que incrementan la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (*e.g.*, NisA y PedPA-1) frente a *L. monocytogenes* en carne fresca (Cleveland *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2005); (iii) el ácido acético, cítrico y láctico, los benzoatos y sorbatos, que aumentan la actividad antimicrobiana de EntAS-48 a pH ácido (4,5) frente *St. aureus* CECT 976 (Ananou *et al.*, 2007); (iv) los agentes químicos de grado alimentario que alteran la permeabilidad de las membranas externas de los microorganismos Gram-negativos (*e.g.*, EDTA), lo que les sensibiliza a diversas bacteriocinas (*e.g.*, NisA) (Stevens *et al.*, 1991; Siragusa *et al.*, 1999), y (v) los tratamientos térmicos, de altas presiones y pulsos eléctricos, que potencian la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (*e.g.*, NisA, PedPA-1, EntA, EntB, EntAS-48, EntL50, SakP y Ltn3147) frente a *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *St. aureus* y *E. coli* 0157:H7 en diversos productos cárnicos y quesos (Morgan *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2002; Arques *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Hereu *et al.*, 2012). Por todo lo anterior, y de acuerdo con el concepto de la “tecnología de los obstáculos” (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000), desarrollado inicialmente por Leistner (1992), las bacteriocinas deberían emplearse como un factor antimicrobiano adicional en un sistema de barreras constituido por múltiples y diversos factores (barreras o métodos) de conservación (físicos, químicos o biológicos) (Cleveland *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). De esta manera, gracias al efecto sinérgico antimicrobiano

derivado de la presencia simultánea de diferentes factores de conservación, podría reducirse la intensidad de los tratamientos aplicados y/o la concentración de sustancias potencialmente peligrosas en los alimentos y, así, aprovechar el potencial de las bacteriocinas como bioconservantes para la obtención de alimentos seguros, con un menor contenido de aditivos químicos y sometidos a tratamientos tecnológicos menos intensos (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000).

En la actualidad, gran parte de las investigaciones sobre las bacteriocinas de las bacterias lácticas se dirigen a eliminar o reducir al mínimo los problemas que plantean algunos de los factores expuestos anteriormente y que suponen una importante limitación para la generalización del empleo de estos péptidos antimicrobianos como bioconservantes alimentarios; por ello, se han propuesto diversas estrategias con la finalidad de aumentar la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos (Nettles y Barefoot, 1993; Abee *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Martínez *et al.*, 2000d), tales como: (i) el empleo combinado de varias bacteriocinas, con el objeto de aumentar su eficacia y espectro de acción antimicrobiana y reducir la tasa de poblaciones bacterianas resistentes (Schillinger *et al.*, 1996; Mulet-Powel *et al.*, 1998); (ii) la expresión heteróloga de genes que codifican bacteriocinas en cultivos iniciadores y/o adjuntos (Gutiérrez, 2005); (iii) el diseño de agrupaciones génicas que permitan la producción de múltiples bacteriocinas (Gutiérrez, 2005); (iv) el diseño, mediante ingeniería genética y proteica, de moléculas con mayor estabilidad y/o solubilidad y con un espectro de actividad antimicrobiana más amplio (Fimland *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1997a; Fimland *et al.*, 1998; Pag y Sahl, 2002a, b; Cotter *et al.*, 2005a; Gillor *et al.*, 2005), y (v) la incorporación de bacteriocinas en los envases (Siragusa *et al.*, 1999; Scannell *et al.*, 2000b; Cha *et al.*, 2003; Neetoo *et al.*, 2007; Blanco-Massani *et al.*, 2008, 2012).

II.3.3.10.2. Otras aplicaciones

El incremento de la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos ha llevado a la industria farmacéutica a explorar nuevas estrategias antimicrobianas que resulten efectivas para el tratamiento de las infecciones humanas y animales. A este respecto, las bacteriocinas podrían constituir una alternativa eficaz, por lo que se han desarrollado numerosos estudios para evaluar el potencial de algunas de ellas como agentes terapéuticos en medicina humana y/o animal y se ha propuesto su empleo en diversas aplicaciones, entre las que se incluyen las siguientes (Ryan *et al.*, 2002; Joerger, 2003; Cotter *et al.*, 2005a, b; Gillor *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007; Gillor y Ghazaryan, 2007; Sit y Vederas, 2008; Montalbán-López *et al.*, 2011; Lohans y Vederas, 2012; Cotter *et al.*, 2013):

1. Tratamiento de la úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori*. Dado que la NisA, producida por *Lactococcus lactis* (Kaletta y Entian, 1989), es efectiva *in vitro* frente a *H. pylori*, se ha propuesto su empleo para el tratamiento de esta enfermedad, ya que, además, es insensible a la pepsina gástrica (pero no a las proteasas pancreáticas) y, en general, su actividad antimicrobiana está favorecida a pH ácido (característico del estómago). Por otra parte, NisA es activa frente a *Clostridium difficile*, causante de la enterocolitis asociada a tratamiento antibiótico, ya que inhibe la germinación de sus esporas (Kim *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005a).

2. Tratamiento y prevención de la mastitis bovina causada por *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. A pesar de la baja solubilidad de NisA a pH fisiológico, esta bacteriocina es el ingrediente activo de dos productos antimicrobianos (CONSEPT® [solución] y WIPE-OUT® [toallita]) comercializados para el tratamiento de la mastitis (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2005a; Díez-González, 2007). Por otra parte, dado que Ltn3147, producida por *Lc. lactis* (Ryan *et al.*, 1996), inhibe a todos los microorganismos Gram-positivos productores de mastitis evaluados hasta la fecha, se ha investigado su empleo en el tratamiento y/o la prevención de mastitis como una alternativa a los tratamientos antibióticos intramamarios, habiéndose demostrado que una formulación que contiene Ltn3147 en un “sello” mamario (TEAT SEAL™) protege eficazmente a los animales frente a *Streptococcus dysgalactiae* y *St. aureus* sin provocar irritación (Ryan *et al.*, 1998, 1999; Twomey *et al.*, 2000; Crispie *et al.*, 2005; Díez-González, 2007). Asimismo, se ha sugerido que las bacteriocinas producidas por cepas de *Staphylococcus* spp. coagulasa-negativas (CNS, del inglés *Coagulase Negative Staphylococci*) activas frente a otras cepas estafilocócicas productoras de mastitis podrían ser útiles, en forma purificada, para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis causada por *Streptococcus* spp. (dos Santos-Nascimento *et al.*, 2005, 2006; Varella-Coelho *et al.*, 2007).
3. Tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Se ha demostrado que las cepas de *St. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA, del inglés *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) y de *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) son sensibles a Ltn3147, mersacidina y actagardina, producidas por *Lc. lactis*, *B. subtilis* y *Actinoplanes* spp., respectivamente, por lo que estos lantibióticos tienen potencial para prevenir/tratar los casos de infecciones animales en los que el tratamiento antibiótico es indeseado o inefectivo (Guder *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2002).
4. Tratamiento del acné causado por *Propionibacterium acnes*. Los lantibióticos Ltn3147, epidermina y gallidermina, producidos por *Lc. lactis*, *St. aureus* y *Staphylococcus gallinarum*, respectivamente, son efectivos frente a *Pr. acnes* y, además, son activos a pH fisiológico, por lo que podrían utilizarse en formulaciones tópicas para el tratamiento del acné (Ross *et al.*, 1999; Pag y Sahl, 2002a, b; Guinane *et al.*, 2005).
5. Prevención de la enfermedad periodontal y tratamiento/prevención de la caries dental causada por *Streptococcus mutans*. Diversos lantibióticos (e.g., NisA y mutacinas) incorporados en colutorios bucales pueden ser útiles para prevenir la enfermedad periodontal (Howell, 1993; Ryan *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2007). Por otra parte, Ltn3147 es activa frente a *Str. mutans*, por lo que su incorporación en pastas dentales y colutorios bucales podría resultar eficaz para la prevención de la caries dental (Guinane *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2006).
6. Prevención de la faringitis producida por *Streptococcus pyogenes*, que causa asimismo mal aliento. Algunas cepas del género *Streptococcus* productoras de lantibióticos efectivos frente a *Str. pyogenes* (e.g., cepas de *Str. mutans* y *Streptococcus salivarius* productoras de mutacina 1140 y salivaricinas A2 y B, respectivamente) pueden ser útiles para el tratamiento de este tipo de faringitis, por lo que podrían utilizarse como terapia de sustitución de los antibióticos (Tagg, 2004; Cotter *et al.*, 2005b).

7. Tratamiento de las infecciones pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa* mediante la administración de piocinas modificadas genéticamente (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Asimismo, recientemente se ha descrito la actividad antagonista de una bacteriocina purificada, producida por *Lactobacillus acidophilus*, frente a cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas de catéteres urinarios, resistentes a diversos antibióticos y formadoras de *biofilms* (Al-Mathkhury *et al.*, 2011).
8. Prevención y tratamiento de infecciones producidas por bacterias patógenas entéricas (*e.g.*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Campylobacter* spp.) mediante la administración de cepas de bacterias Gram-negativas productoras de bacteriocinas (colicinas o microcinas) o de bacteriocinas (producidas por *Bacillus* spp. o *Paenibacillus* spp.) microencapsuladas que, posiblemente, reducen o previenen la adquisición de nuevas cepas patógenas (Zhao *et al.*, 1998; Gillor *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2006; Díez-González, 2007).
9. Tratamiento de infecciones virales. La cinamicina, lantiopeptina y la enterocina CRL35 (EntCRL35), producidas por *Streptomyces* spp., *Streptoverticillium cinnamoneum* y *Enterococcus mundtii* CRL35, respectivamente, inhiben la replicación del virus herpes simple (Naruse *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 2002; Wachsman *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que la enterocina ST4V (EntST4V) producida por *E. mundtii* ST4V inactiva diversos virus (Todorov *et al.*, 2005). De forma similar, la bacteriocina ST5Ha producida por *Enterococcus faecium* ST5Ha, presenta actividad antiviral frente al virus HSV-1 (Todorov *et al.*, 2010).

Por otra parte, debido a la actividad antimicrobiana de algunas bacteriocinas frente a bacterias ruminales Gram-positivas (productoras de metano y amonio) y a la presencia en el rumen de bacterias bacteriocinogénicas, se ha sugerido la utilización de las bacteriocinas como aditivos alimentarios para el ganado, como una alternativa al empleo de antibióticos ionóforos, con el objeto de mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal limitando la pérdida de energía y nitrógeno a través de la producción microbiana de metano y amonio, respectivamente. En este contexto, una posible ruta de administración de las bacteriocinas sería mediante ensilados fermentados por bacterias bacteriocinogénicas (Kalmokoff *et al.*, 1996; Lauková y Czikková, 1998; Mantovani y Russell, 2002; Russell y Mantovani, 2002; Cookson *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b; Díez-González, 2007; Giraffa *et al.*, 2010). Además, debido a la potente actividad antimicrobiana de algunas bacteriocinas, se ha sugerido su empleo con finalidades adicionales, entre las que destacan:

1. Tratamiento de aguas residuales procedentes de granjas (purines), ya que algunas bacteriocinas (*e.g.*, enterocina V24) inhiben a bacterias patógenas Gram-positivas (*e.g.*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.) y, en ocasiones, también a bacterias Gram-negativas (*e.g.*, *Yersinia enterocolitica*) presentes en estos sustratos (Lauková *et al.*, 1998, 2000).
2. Tratamiento de semillas de alfalfa con ciertas bacteriocinas (*e.g.*, colicina del tipo E2) para evitar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en brotes de alfalfa (Nandiwada *et al.*, 2004).
3. Conservación de cosméticos y desodorantes (*e.g.*, mediante el empleo de gallidermina) (Ryan *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005a).

4. Prevención de la colonización por bacterias Gram-positivas y por *E. coli* de catéteres tratados con NisA y colicinas, respectivamente (Bower *et al.*, 2001, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Trautner *et al.*, 2005).
5. Tratamiento y prevención de diversas infecciones bacterianas en vegetales, ya que algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (*e.g.*, piocinas) inhiben a bacterias patógenas productoras de enfermedades en diversas especies vegetales (Gillor *et al.*, 2005).

Por último, se ha descrito que, además de su actividad antimicrobiana, las bacteriocinas poseen otras actividades biológicas, por lo que también se ha propuesto su empleo, entre otras, con los siguientes objetivos:

1. Inmunopotenciación y regulación de la presión sanguínea. Los lantibióticos duramicina y ancovenina, producidos por *Streptomyces* spp. y *Streptoverticillium* spp., respectivamente, y cinamicina, producida por *Streptomyces* spp., tienen efecto inmunomodulador y regulador de la presión sanguínea derivado de su actividad inhibidora de la función de la enzima fosfolipasa A2 (relacionada con la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos) y enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés *Angiotensin Converting Enzyme*) (Ryan *et al.*, 2002).
2. Tratamiento anticonceptivo y espermicida. Se ha descrito que NisA es eficaz como anticonceptivo (Aranha *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b) y que Ltn3147 y subtilisina A, producida por *Bacillus licheniformis*, son eficaces como espermicidas (Silkin *et al.*, 2008).
3. Agentes potencialmente anticancerígenos, debido a la capacidad de algunas bacteriocinas (*e.g.*, piocinas, colicinas y microcinas) de inhibir el crecimiento de las células eucariotas mediante la inducción de apoptosis o muerte celular programada de células eucariotas cancerígenas (Hetz *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Lagos *et al.*, 2009; Shaikh *et al.*, 2012).
4. Tipificación de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales mediante la determinación del patrón de producción de bacteriocinas con actividad frente a un conjunto estándar de microorganismos indicadores o del patrón de susceptibilidad frente a un conjunto estándar de bacteriocinas; no obstante el empleo de esta técnica es poco frecuente, salvo en los casos en que resulta difícil su tipificación utilizando los métodos habituales (*e.g.*, micobacterias y algunos bacilos Gram-negativos) y, además, requiere que se utilicen métodos complementarios (Daw y Falkiner, 1996).

II.4. GÉNERO *Lactobacillus*

II.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

El género *Lactobacillus*, junto con los géneros *Pediococcus* y *Paralactobacillus*, pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, una de las 6 familias que comprende el orden *Lactobacillales*, en el que se incluyen los géneros que componen el grupo de bacterias lácticas (Tabla II.14) (sección II.2.1). La familia más cercana filogenéticamente es la familia *Leuconostocaceae*, que incluye los géneros *Leuconostoc*,

Oenococcus y *Weissella* (Garritty *et al.*, 2004; Hammes y Hertel, 2006; Claesson *et al.*, 2007, 2008; Felis y Dellaglio, 2007; Giraffa *et al.*, 2010; Kleerebezem *et al.*, 2010; Barrangou *et al.*, 2012). El género *Lactobacillus* es el más amplio de los comprendidos dentro del grupo de las bacterias lácticas, con más de 100 especies descritas, entre las que se encuentran microorganismos bien caracterizados y de gran importancia biológica, tecnológica y comercial como *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* o *Lb. salivarius* (Klerebezeem y Vaughan, 2009; Giraffa *et al.*, 2010). Etimológicamente, el término *Lactobacillus* proviene del latín *lact* que significa leche y *bacillum* que significa bastoncillo, de forma que la traducción literal es “bastoncillo de la leche”. Este género fue descrito por primera vez en 1901 por Beijerinck, y junto con los demás géneros pertenecientes al grupo de bacterias lácticas, ha sido históricamente clasificado y organizado en grupos basándose exclusivamente en características fenotípicas (Pot y Tsakalidou, 2009). El primer intento de clasificación de los lactobacilos lo realizó Orla-Jensen (1919), quien los dividió en tres géneros distintos según su temperatura óptima de crecimiento y los productos finales de su metabolismo fermentativo. Posteriormente, Kandler y Weiss (1986) consideraron que la división de Orla-Jensen no originaba grupos homogéneos desde el punto de vista filogenético, por lo que propusieron una clasificación de los miembros de este género basada en el potencial homo/heterofermentativo obligado/facultativo. El primer análisis filogenético de los lactobacilos lo realizaron Collins *et al.* (1991) con las especies descritas en aquel momento para este género, proponiendo tres grupos filogenéticos: (i) grupo *Lb. casei-Pediococcus*; (ii) grupo *Lactobacillus delbrueckii*, y (iii) grupo *Leuconostoc*. Poco después, Collins *et al.* (1993) reclasificaron algunas especies de *Lactobacillus* en los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*, reduciendo así la heterogeneidad de este género. Unos años más tarde, Schleifer y Ludwig (1995) renombraron el grupo *Lb. delbrueckii* como *Lb. acidophilus* y el grupo *Lb. casei-Pediococcus* fue dividido en cinco grupos más pequeños: (i) grupo *Lb. casei*; (ii) grupo *Lb. plantarum*; (iii) grupo *Lactobacillus reuteri*; (iv) grupo *Lactobacillus buchneri*, y (v) grupo *Lb. salivarius*. Actualmente, la estructura filogenética del género *Lactobacillus* también incluye el grupo *Lactobacillus perolens*, el grupo *Pediococcus* y el grupo *Lactobacillus vitilinus-cateniformis* (Felis and Dellaglio, 2007; Pot y Tsakalidou, 2009) (Tabla II.20). Con el desarrollo de las técnicas moleculares, la nomenclatura del género *Lactobacillus* ha ido reajustándose. A este respecto, se han identificado nuevos grupos basándose en la secuenciación del ARN ribosómico (ARNr) 16S (Collins *et al.*, 1991), se han reclasificado algunas especies (e.g., *Lactobacillus fructosus* en *Leuconostoc fructosum*; Antunes *et al.*, 2002) y se han descrito otras nuevas (e.g., *Lactobacillus cypricasei* sp. nov.; Lawson *et al.*, 2001). En definitiva, la lista de especies pertenecientes al género *Lactobacillus* ha ido cambiando enormemente en los últimos años como reflejo del extraordinario grado de diversidad fenotípica y genotípica de este género y es posible que lo siga haciendo a medida que se vaya avanzando en la secuenciación del genoma de más especies de este género (Claesson *et al.*, 2007, 2008; Felis y Dellaglio, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Pot y Tsakalidou, 2009; Giraffa *et al.*, 2010; Forde *et al.*, 2011). Hasta la fecha han sido publicadas, al menos, la secuencia genética completa de las especies *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*,

Lactobacillus reuteri y *Lactobacillus kefiranofaciens*, y hay más proyectos de secuenciación en desarrollo que pueden suponer cambios nuevos en el orden *Lactobacillales* (Claesson *et al.*, 2007; Felis y Dellaglio, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Kant *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Morelli *et al.*, 2012). Actualmente, este género comprende microorganismos de morfología bacilar o cocobacilar, a menudo organizados en cadenas, no esporulados, anaerobios facultativos o microaerófilos, catalasa-negativos, acidófilos o acidúricos y con un contenido en G+C que varía del 33 al 55 mol% (Tannock, 2004; Hammes y Hertel, 2006; Felis y Dellaglio, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010) (Tabla II.20). Los lactobacilos crecen en un rango de temperatura entre 2 y 53°C aunque su óptimo se sitúa entre 30 y 40°C, y un rango de pH entre 5,5 y 6,2 (Dicks y Endo, 2009; du Toit *et al.*, 2011). Tienen requerimientos nutricionales complejos, siendo su metabolismo estrictamente fermentativo, y pudiéndose dividir en 3 grupos según su patrón de fermentación de azúcares: (i) homofermentativos obligados como *Lb. acidophilus*; (ii) heterofermentativos facultativos como *Lactobacillus curvatus*, y (iii) heterofermentativos obligados como *Lactobacillus reuteri* (Pot *et al.*, 1994; Hammes y Vogel, 1995; Hammes y Hertel, 2006; Claesson *et al.*, 2007). Los microorganismos homofermentativos fermentan la glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), obteniendo mayoritariamente ácido láctico como producto final de su metabolismo, mientras que los heterofermentativos fermentan la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato, obteniendo, además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y ácido acético (Fig. 2.15) (Caplice y Fitzgerald, 1999; Hammes y Hertel, 2006; Giraffa *et al.*, 2010). Conviene destacar que este comportamiento metabólico juega un papel fundamental en la producción de productos lácteos fermentados como queso, yogur y leches fermentadas (Bernardeau *et al.*, 2008).

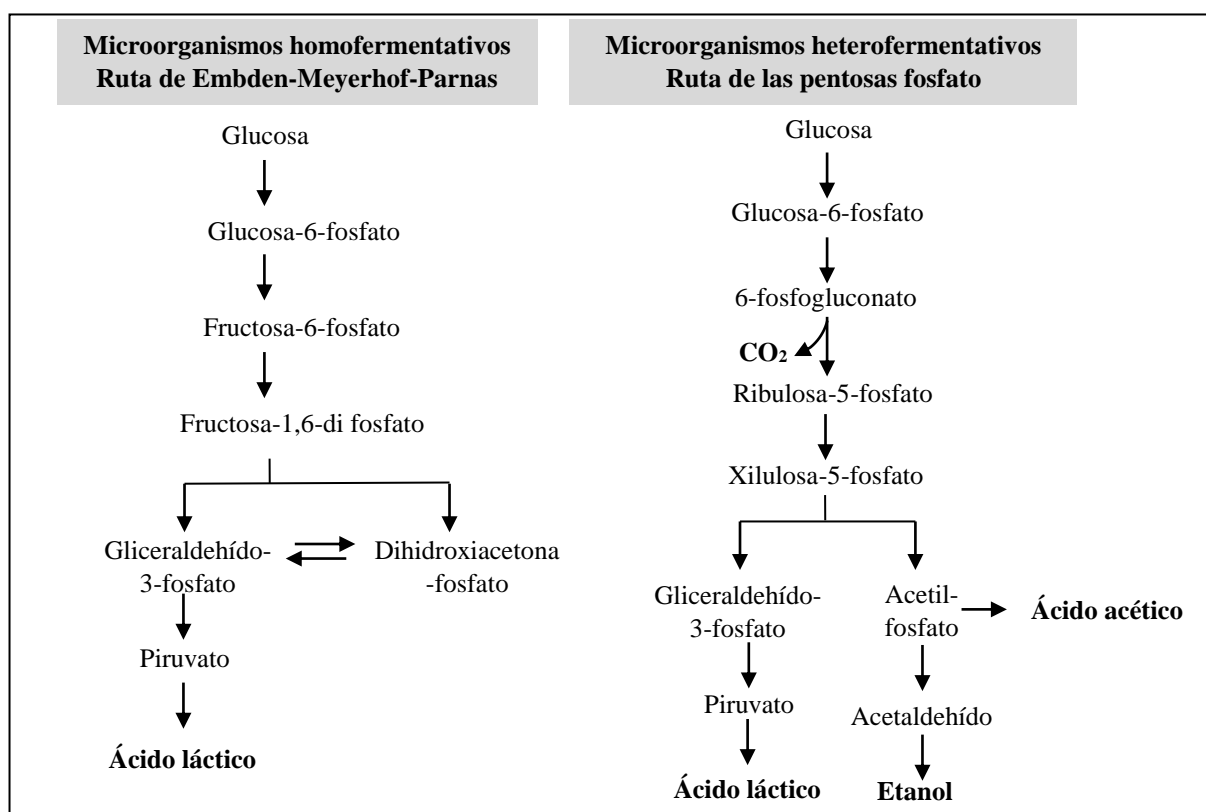


Figura 2.15. Esquema general de las rutas de fermentación de la glucosa por los lactobacilos y otras bacterias lácticas. Adaptado de Caplice y Fitzgerald (1999).

Tabla II.20. Especies y principales características taxonómicas del género *Lactobacillus*.

Especie	Metabolismo ^a	Grupo filogenético ^b	Contenido G+C ^c	Isómero del ácido láctico ^d
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	B	delb	35–37	DL
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	C	buch	51	DL
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	B	sal	38–41	L
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A	delb	34–37	DL
<i>Lactobacillus agilis</i>	B	sal	43–44	L
<i>Lactobacillus algidus</i>	B	sal-ss	36–37	L
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	B	al-far	36–37	L-DL
<i>Lactobacillus amyolyticus</i>	A	delb	39	DL
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	A	delb	44–46	L
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	A	delb	43.5	L
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	A	delb	40–41	DL
<i>Lactobacillus animalis</i>	A	sal	41–44	L
<i>Lactobacillus antri</i>	C	reu	44–45	DL
<i>Lactobacillus apodemi</i>	B	sal	38.5	L
<i>Lactobacillus aviarius</i> subesp. <i>araffinosus</i>	A	sal	39–43	DL (D <15%)
<i>Lactobacillus aviarius</i> subesp. <i>aviarius</i>	A	sal	39–43	DL
<i>Lactobacillus bifementans</i>	B	cor	45	DL
<i>Lactobacillus brevis</i>	C	bre	44–47	DL
<i>Lactobacillus buchneri</i>	C	buch	44–46	DL
<i>Lactobacillus casei</i>	B	cas	45–47	L
<i>Lactobacillus cateniformis</i>	A	Na	31–33	D
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	B	reu	Nd	DL
<i>Lactobacillus collinoides</i>	C	cou3	46	DL
<i>Lactobacillus composti</i>	B	cor	48	DL
<i>Lactobacillus concavus</i>	A	Pdex	46–47	DL (D 5%)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subesp. <i>coryniformis</i>	B	cor	45	DL (L <15%)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subesp. <i>torquens</i>	B	cor	45	D
<i>Lactobacillus crispatus</i>	A	delb	35–38	DL
<i>Lactobacillus curvatus</i>	B	sakei	42–44	DL
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	A	delb	49–51	D
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	A	delb	49–51	D
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>indicus</i>	A	delb	Nd	D
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i>	A	delb	49–51	D
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	C	buch	Nd	Nd
<i>Lactobacillus equi</i>	A	sal	38–39	DL
<i>Lactobacillus farciminis</i>	A	al-far	34–36	DL (D <15%)
<i>Lactobacillus farraginis</i>	B	buch	40–41	DL
<i>Lactobacillus fermentum</i>	C	reu	52–54	DL
<i>Lactobacillus fornicalis</i>	B	delb	37	DL
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	C	fru	38–41	DL
<i>Lactobacillus frumenti</i>	C	reu	43–44	L
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	B	sakei	41–42	L (D <40%)
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	A	delb	36–37	DL
<i>Lactobacillus gasseri</i>	A	delb	33–35	DL
<i>Lactobacillus gastricus</i>	C	reu	41–42	DL
<i>Lactobacillus graminis</i>	B	sakei	41–43	DL
<i>Lactobacillus hammesii</i>	B	bre	Nd	DL
<i>Lactobacillus hamsteri</i>	B	delb	33–35	DL
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	B	per	53–54	L
<i>Lactobacillus helveticus</i>	A	delb	38–40	DL
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	C	buch	39–41	DL
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	B	fru	35–38	DL
<i>Lactobacillus iners</i>	A	delb	34–35	L
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	C	reu	49–50	Nd
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	B	delb	33–35	DL
<i>Lactobacillus jensenii</i>	B	delb	35–37	D
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	A	delb	33–35	DL
<i>Lactobacillus kalixensis</i>	A	delb	35–36	DL
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subesp. <i>kefiranofaciens</i>	A	delb	34–38	DL
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subesp. <i>kefirgranum</i>	A	delb	34–38	DL
<i>Lactobacillus kefiri</i>	C	buch	41–42	DL
<i>Lactobacillus kimchii</i>	B	al-far	35	DL
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	B	delb	37–40	DL
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	C	ss	Nd	L
<i>Lactobacillus lindneri</i>	C	fru	35	DL

Tabla II.20. Continuación.

Especie	Metabolismo	Grupo filogenético	Contenido G+C	Isómero del ácido láctico
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	C	ss	41–42	Nd
<i>Lactobacillus mali</i>	A	sal	32–34	L
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	A	cou3	48–49	L
<i>Lactobacillus mindensis</i>	A	al-far	37–38	DL
<i>Lactobacillus mucosae</i>	C	reu	46–47	DL
<i>Lactobacillus murinus</i>	B	sal	43–44	L
<i>Lactobacillus nagelii</i>	A	sal	Nd	DL
<i>Lactobacillus namurensis</i>	C	buch	52	DL
<i>Lactobacillus nantensis</i>	B	al-far	38,6	DL
<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	C	Pdex	35,3– 39,9	DL (D 30%)
<i>Lactobacillus oris</i>	C	reu	49–51	DL
<i>Lactobacillus panis</i>	C	reu	49–51	DL
<i>Lactobacillus pantheris</i>	A	ss	52–53	D
<i>Lactobacillus parabrevis</i>	C	bre	49	DL
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	C	buch	44	Nd
<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>	B	cas	45–47	L
<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>tolerans</i>	B	cas	45–47	L
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	C	per	44–45	D
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	B	buch	40	DL (D < 70%)
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	C	buch	41–42	L
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	B	al-far	37–38	Nd
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	B	plan	44–45	DL
<i>Lactobacillus pentosus</i>	B	plan	46–47	DL
<i>Lactobacillus perolens</i>	B	per	49–53	L
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B	plan	44–46	DL
<i>Lactobacillus plantarum</i> subesp. <i>argenteratensis</i>	B	plan	44–46	DL
<i>Lactobacillus pontis</i>	C	reu	53–56	DL
<i>Lactobacillus psittaci</i>	C	delb	Nd	Nd
<i>Lactobacillus rennini</i>	B	cor	Nd	DL
<i>Lactobacillus reuteri</i>	C	reu	40–42	DL
<i>Lactobacillus rhammosus</i>	B	cas	45–47	L
<i>Lactobacillus rossiae</i>	C	cou1	44–45	DL
<i>Lactobacillus ruminis</i>	A	sal	44–47	L
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	A	sal	42–43	DL
<i>Lactobacillus sakei</i> subesp. <i>carneus</i>	B	sakei	42–44	DL
<i>Lactobacillus sakei</i> subesp. <i>sakei</i>	B	sakei	42–44	DL
<i>Lactobacillus salivarius</i>	A	sal	34–36	L
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	C	fru	36–38	DL
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	A	sal	39–41	L
<i>Lactobacillus secaliphilus</i>	B	reu	48	L (D 5%)
<i>Lactobacillus sharpeae</i>	A	ss	53	L
<i>Lactobacillus siliginis</i>	C	cou1	44,5	Nd
<i>Lactobacillus sobrius</i>	B	delb	35–36	DL
<i>Lactobacillus spicheri</i>	B	buch	55	DL
<i>Lactobacillus suebicus</i>	C	cou2	40–41	DL
<i>Lactobacillus tuccei</i>	A	al-far	Nd	DL
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	A	delb	35–36	DL
<i>Lactobacillus vaccinostrercus</i>	C	cou2	36–37	Nd
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	C	reu	38–41	Nd
<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	A	al-far	40–41	L
<i>Lactobacillus vini</i>	B	sal	39,4	DL
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	A	Na	34–37	D
<i>Lactobacillus zaeae</i>	B	cas	48–49	L
<i>Lactobacillus zymae</i>	C	buch	53–54	DL

^aTipo de fermentación de la glucosa según la nomenclatura establecida por Hammes y Hertel (2003): homofermentativa obligada (A), heterofermentativa facultativa (B), y heterofermentativa obligada (C). ^bGrupo filogenético asignado según Felis y Dellaglio (2007) abreviado como: delb, grupo *Lb. delbrueckii* o *Lb. acidophilus*; buch, grupo *Lb. buchneri*; sal, grupo *Lb. salivarius*; ss, grupo de especies únicas (del inglés, *single species*); al-far, grupo *Lb. alimentarius-Lb. farciminis*; reu, grupo *Lb. reuteri*; cor, grupo *Lb. coryniformis*; bre, grupo *Lb. brevis*; cas, grupo *Lb. casei*; sakei, grupo *Lb. sakei*; fru, grupo *Lb. fructivorans*; per, grupo *Lb. perolens*; plan, grupo *Lb. plantarum*; Pdex, grupo *Pediococcus dextrinicus*; cou, parejas de *Lactobacillus* (del inglés, *couples*); Na, no aplicable, especies escasamente relacionadas con este género. ^cContenido de G+C en mol%. ^dIsómero del ácido láctico producido tras la fermentación. Nd, no determinado. Adaptado de Felis y Dellaglio (2007).

Los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* están ampliamente distribuidos en la naturaleza como consecuencia de su gran versatilidad metabólica, habiéndose encontrado en multitud de nichos ecológicos (Stiles, 1996; Hammes y Hertel, 2006; Felis y Dellaglio, 2007; Giraffa *et al.*, 2010; Barrangou *et al.*, 2012). En este contexto, se encuentran en hábitats con gran disponibilidad de hidratos de carbono, habiéndose aislado de una gran variedad de alimentos, plantas y material de origen vegetal, estiércol, aguas residuales humanas e insectos (Tannock, 2004; Vaughan *et al.*, 2005; Canchaya *et al.*, 2006; Hammes y Hertel, 2006; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; du Toit *et al.*, 2011); asimismo, forman parte de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal del hombre y de la mayoría de los animales, encontrándose también en las mucosas de la cavidad oral y vagina humana y en la leche materna (Tannock, 2004; Canchaya *et al.*, 2006; Hammes y Hertel, 2006; Lara-Villoslada *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; Kleerebezem *et al.*, 2010). También se ha descrito el potencial terapéutico y profiláctico de algunas cepas del género *Lactobacillus*, que han sido propuestas como probióticos (sección II.4.2.2.1) (Sanders, 2003; Zhou *et al.*, 2005; Giraffa *et al.*, 2010), así como su papel en la modulación del estrés, mejora de los síntomas de ansiedad y regulación de la respuesta emocional debido a su participación en el denominado eje microbioma-intestino-cerebro (Rao *et al.*, 2009; Silk *et al.*, 2009; Cryan y O'Mahony, 2011; Bravo *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y de que son frecuentemente utilizados en alimentación, se han encontrado casos de infecciones oportunistas causadas por cepas del género *Lactobacillus* (sección II.4.4) (Bessis *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2010). En cualquier caso, conviene destacar que muchos de los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*, junto con otros géneros del grupo de las bacterias lácticas, han obtenido la calificación de QPS por parte de la EFSA (sección II.4.2.2) (EFSA, 2004, 2007).

II.4.2. IMPORTANCIA DE LOS LACTOBACILOS EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y FARMACÉUTICA

II.4.2.1. LACTOBACILOS Y ALIMENTOS

Los microorganismos del género *Lactobacillus* están estrechamente relacionados con los alimentos desde tiempos inmemoriales, principalmente porque contribuyen a su conservación debido a la disminución del pH como consecuencia de su metabolismo fermentativo, pero también porque colaboran en la producción y mejora del sabor, textura y aspectos nutricionales de algunos alimentos (Stiles, 1996; Claesson *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; Kleerebezem *et al.*, 2010; Barrangou *et al.*, 2012). En este contexto, juegan un papel fundamental en la producción de alimentos fermentados, fundamentalmente productos lácteos fermentados, siendo además utilizados como microorganismos iniciadores o *starters* en varios tipos de quesos, alimentos a base de vegetales fermentados, carnes fermentadas, vinos, algunos tipos de pan y ensilados (Claesson *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; du Toit *et al.*, 2011). Además, la actividad proteolítica y la producción de compuestos aromáticos, bacteriocinas y EPS son características relevantes de estos microorganismos que

influyen en la calidad y valor nutricional de los alimentos, lo que hace que algunos lactobacilos tengan importantes aplicaciones biotecnológicas (Leroy y de Vuyst, 2004; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010)

II.4.2.1.1. Presencia natural de lactobacilos en leche y productos lácteos

La leche y los productos lácteos fermentados como el queso, el yogur o las leches fermentadas, son uno de los principales nichos ecológicos en los que se pueden encontrar cepas del género *Lactobacillus*, debido a la buena adaptación de estos microorganismos a estos sustratos que contienen lactosa como principal fuente de carbono, caseínas como fuente de proteínas y, además, vitaminas y minerales (Bernardeau *et al.*, 2008; Callanan *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; Barrangou *et al.*, 2012). A continuación, se describe la participación de los lactobacilos en la elaboración de productos lácteos fermentados:

1. Queso. Algunas cepas del género *Lactobacillus* se encuentran tanto en quesos artesanales, elaborados a partir de leche cruda, como en quesos pasteurizados, elaborados a escala industrial, puesto que además de encontrarse en la leche, también se encuentran en el ambiente que rodea a la producción de quesos (Wouters *et al.*, 2002; Hammes y Hertel, 2006). Asimismo, pueden formar parte del cultivo iniciador, cuya principal función es producir ácido láctico a partir de lactosa con la consecuente acidificación del medio y la coagulación de las proteínas de la leche (Beresford *et al.*, 2001; Giraffa *et al.*, 2010). Más frecuentemente, los lactobacilos forman parte de la microbiota láctica que no forma parte del cultivo iniciador (NSLAB) contribuyendo a la maduración del queso, principalmente por su actividad proteolítica y su implicación en la producción de aromas (Kanawjia *et al.*, 1993; Beresford *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2002; Kieronczyk *et al.*, 2003; Badel *et al.*, 2011). La composición de la NSLAB varía según el tipo de queso y, dentro de un mismo tipo de queso, según la etapa del procesado y la edad del mismo (Fitzsimons *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2002). Diversos estudios han demostrado la gran diversidad del género *Lactobacillus* en distintos tipos de quesos, siendo las especies aisladas con más frecuencia *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. curvatus* (Beresford *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2002; Herreros *et al.*, 2003; Psoni *et al.*, 2003; Carminati *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2011).
2. Yogur. Este producto se obtiene por la fermentación de la leche con una mezcla equimolar de cepas de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, comúnmente llamados *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* (Wouters *et al.*, 2002; Guarner *et al.*, 2005; Ashra y Shah, 2011; Badel *et al.*, 2011). Estos dos microorganismos tienen una acción sinérgica en el proceso de elaboración del yogur; así pues, *Lb. bulgaricus* comienza a crecer primero, produciendo los metabolitos necesarios para el crecimiento de *Str. thermophilus*, el cual, a su vez, libera ácido fórmico y dióxido de carbono que estimula el crecimiento del lactobacilo (Wouters *et al.*, 2002; Badel *et al.*, 2011). Conviene señalar que ambas cepas son productoras de EPS, que desempeñan un importante papel no completamente conocido en las propiedades reológicas del yogur (Wouters *et al.*, 2002; Badel *et al.*, 2011). Por otra parte, el yogur es un alimento al que se le atribuyen numerosas

propiedades beneficiosas y además es ampliamente consumido, por lo que la tendencia en los últimos años es añadir cultivos probióticos a este producto, bien buscando que los propios cultivos iniciadores (*Lb. bulgaricus* y/o *Str. Thermophilus*) se ajusten a la definición de probiótico, o bien añadiendo cepas probióticas como *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* y/o *Bifidobacterium* spp. junto con los cultivos iniciadores (Guarner *et al.*, 2005; Bernardeau *et al.*, 2008; Ashra y Shah, 2011).

3. Kéfir. Esta leche fermentada originaria de las montañas del Cáucaso, que se ha hecho bastante popular en muchos países europeos, se diferencia de otros productos similares en que no es el resultado de la actividad metabólica de una sola especie microbiana sino de un conjunto de especies confinadas en una matriz de “gránulos de kéfir”. Estos gránulos blancos, irregulares, gelatinosos y con una estructura en forma de coliflor de tamaño variable, están compuestos de proteínas y polisacáridos. En ellos se, aloja una compleja microbiota compuesta por levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas (entre las que destacan microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*) (Garrote *et al.*, 2010) que coexiste en una asociación simbiótica y que es responsable de la fermentación ácido-alcohólica de la leche.

II.4.2.1.2. Presencia natural de lactobacilos en carne y productos cárnicos

La carne y los productos cárnicos son otro de los nichos ecológicos donde se pueden encontrar cepas del género *Lactobacillus*. Los ecosistemas cárnicos permiten el crecimiento de asociaciones de microorganismos muy específicas y cuya presencia depende de factores como el procesado, el transporte y el almacenamiento. Así, la presencia de lactobacilos en el tracto gastrointestinal de los animales puede conducir a una alta contaminación de la canal durante su sacrificio, especialmente si la manipulación es inadecuada (Vignolo *et al.*, 2010). Por otra parte, durante el almacenamiento de la carne en refrigeración, niveles altos de lactobacilos psicrótrofos pueden llevar a alteraciones organolépticas de la carne, produciendo olores y/o sabores no deseables (Borch *et al.*, 1996; Vignolo *et al.*, 2010). Además, si la carne está envasada al vacío o en atmósferas modificadas se favorece el crecimiento de los lactobacilos psicrótrofos frente a otras bacterias, ya que la falta de oxígeno no inhibe el desarrollo de la microbiota láctica, pero sí el crecimiento de los microorganismos causantes de la alteración de la carne en aerobiosis (Borch *et al.*, 1996; Vignolo *et al.*, 2010). Entre los lactobacilos, *Lb. sakei* es el microorganismo mejor adaptado al crecimiento en carnes y productos cárnicos, debido a, entre otros aspectos, su alta actividad proteolítica, que le permite obtener los aminoácidos necesarios para su desarrollo. A partir del análisis del genoma de *Lb. sakei*, también se ha observado que esta especie puede crecer a bajas temperaturas y en presencia de altas concentraciones de NaCl, características asociadas a genes que codifican proteínas de respuesta a condiciones de estrés (Chaillou *et al.*, 2005; Vignolo *et al.*, 2010). Por otra parte, en embutidos fermentados (*e.g.*, salchichón, chorizo y salami), *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* y *Lb. plantarum* aparecen en niveles elevados, contribuyendo activamente al desarrollo de la fermentación (Huerta *et al.*, 2004; Aymerich *et al.*, 2000a, 2006; Urso *et al.*, 2006a; Benito *et al.*, 2007; Talon *et al.*, 2008; Cocolin *et al.*, 2009; Vignolo *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2012; Marty *et al.*, 2012).

Numerosos estudios demuestran el importante papel de los lactobacilos en el desarrollo de los embutidos fermentados y la gran importancia en su proceso de elaboración (Leroy *et al.*, 2006; Vignolo *et al.*, 2010; Cocolin *et al.*, 2011). Estos microorganismos son los responsables de metabolizar los azúcares presentes y/o añadidos a la masa cárnica, con la consecuente producción de ácido láctico y la disminución del pH a valores de 4,8–5, contribuyendo así a la firmeza del producto y asegurando una estabilidad microbiológica satisfactoria al prevenir el crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos (Urso *et al.*, 2006b; Benito *et al.*, 2007; Cocolin *et al.*, 2011; Marty *et al.*, 2012). Los lactobacilos también contribuyen al desarrollo del sabor y el aroma debido a su actividad glicolítica, proteolítica y, en menor medida, lipolítica (Leroy *et al.*, 2006; Urso *et al.*, 2006a; Benito *et al.*, 2007). Además, pueden incrementar la calidad higiénica del producto debido a la producción de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* y frente a otros microorganismos alterantes y patógenos (Urso *et al.*, 2005; 2006b; Jones *et al.*, 2008). Muchos embutidos fermentados son elaborados de forma tradicional y en su proceso de elaboración no se emplean cultivos iniciadores; sin embargo, pueden utilizarse algunos microorganismos aislados de la microbiota autóctona del producto que contribuyen a mejorar y controlar la calidad y seguridad del producto final así como a estandarizar el proceso de producción (Leroy *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2008). En los últimos años, el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración industrial de embutidos fermentados está favoreciendo la búsqueda de cultivos funcionales (*e.g.*, probióticos o cepas con alguna ventaja tecnológica) y su aplicación como cultivos iniciadores en este tipo de productos (Leroy *et al.*, 2006; Urso *et al.*, 2006b; Talon *et al.*, 2008; Ruiz-Moyano *et al.*, 2011).

II.4.2.1.3. Presencia natural de lactobacilos en vegetales y material de origen vegetal

Los lactobacilos se encuentran de forma natural en un gran número de especies vegetales y en productos vegetales fermentados; a este respecto, existen diversos estudios en los que se han aislado lactobacilos de aceitunas verdes y negras, uvas, zumo de pomelo, vino, cerveza, marula, ensilados, *sourdough* (una “masa ácida” que consiste en una mezcla de harina y agua, fermentada por bacterias lácticas y levaduras), *sauerkraut* (col ácida) y *kimchi* (col china fermentada) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 2001; Todorov y Dicks, 2004, 2005; Settanni y Corsetti, 2008; Font de Valdez *et al.*, 2010; Prins *et al.*, 2010; Hurtado *et al.*, 2011b; Lerm *et al.*, 2011; Mtshali *et al.*, 2012; Park y Kim, 2012). Los lactobacilos aislados con más frecuencia de vegetales fermentados son *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. brevis*, *Lb. cellobiosus* y *Lb. fermentum* (Park y Kim, 2012). Entre las distintas funcionalidades descritas para cepas aisladas de productos vegetales, además de la producción de bacteriocinas y las características probióticas descritas para el *kimchi*, cabe destacar la alta producción de ácido linoléico conjugado (CLA, del inglés *Conjugated Linoleic Acid*) por una cepa de *Lb. plantarum* aislada de *sauerkraut* (Zeng *et al.*, 2009; Park y Kim, 2012).

II.4.2.1.4. Presencia natural de lactobacilos en pescado y productos pesqueros

En los últimos años ha aumentado notablemente el interés por el aislamiento y la identificación de bacterias lácticas procedentes del medio marino, tanto de pescados, mariscos y productos de la pesca como del medio acuático que los rodea (Lauzon y Ringø, 2012). La estrecha relación de los animales acuáticos con el medio en el que se desarrollan sugiere que la absorción de microorganismos a través de los procesos de osmorregulación y alimentación puede influir en la microbiota final de la piel, agallas y tracto gastrointestinal; sin embargo, esto es cierto sólo en los primeros estadios de la vida, ya que se ha observado que la microbiota que predomina en el ambiente no es necesariamente la que se establece finalmente en los adultos (Hansen y Olafsen, 1989; Lauzon y Ringø, 2012). Además, debido a la naturaleza poiquiloterma de los animales acuáticos, fluctuaciones ambientales, como por ejemplo un cambio en la temperatura del agua, pueden dar lugar a variaciones en su microbiota (Gram y Huss, 1996; Lauzon y Ringø, 2012). Por otra parte, la salinidad del agua y la composición de la dieta son los factores que más influyen en la microbiota gastrointestinal de los peces (Ringø y Strøm, 1994; Lauzon y Ringø, 2012). A pesar de todas estas posibles influencias en la microbiota de los peces, el género *Lactobacillus* ha sido aislado de especies de los diferentes ambientes acuáticos (peces de agua dulce y agua salada, y peces de agua templada y agua fría) y de especies con diferentes tipos de alimentación (especies planctófagas, bentófagas y eurífagas) poniendo de manifiesto, una vez más, la naturaleza ubicua y la gran capacidad de adaptación de los microorganismos de este género a los distintos medios (Bucio *et al.*, 2006; Izvekoba *et al.*, 2007; Lauzon y Ringø, 2012). A este respecto, se han aislado lactobacilos de distintas localizaciones en diversas especies acuáticas tales como el tracto digestivo de salmones y bacalao (Ringø *et al.*, 1995; Lauzon *et al.*, 2010), la mucosa epitelial de la trucha alpina, la lubina europea y el esturión (Ringø *et al.*, 1998; Carnevali *et al.*, 2006; Askarian *et al.*, 2009) y diversos peces de agua dulce y su entorno (Ringø y Gatesoupe, 1998; González *et al.*, 2000; Bucio *et al.*, 2006) (Tabla II.21). Por otra parte, también se han aislado lactobacilos de productos pesqueros tales como langostinos frescos y congelados (Nair y Surendran, 2005), almejas (Bourouni *et al.*, 2007), ostras (Lee *et al.*, 2010), diversos pescados fermentados tailandeses (Tanasupawat *et al.*, 1998; Kopermsub y Yunchalard, 2010), y pescado ahumado y envasado al vacío (Jeppesen y Huss, 1993; Leroi *et al.*, 1998; Lyhs *et al.*, 1999), y se han utilizado con éxito mezclas de cepas de este género como cultivos iniciadores del *plaa-som* (pescado fermentado típico tailandés) (Saithong *et al.*, 2010). Sin embargo, microorganismos de este género también están asociados al deterioro del arenque fermentado, un producto muy popular en Holanda (Lyhs y Björkroth, 2008).

También se han aislado lactobacilos de otros ambientes acuáticos, como la superficie de sedimentos de un estuario en Argentina (Sica *et al.*, 2010), muestras de agua obtenidas de diferentes ríos del norte de España (González *et al.*, 1999) y diferentes lagos de Japón (Yanagida *et al.*, 2007). La especie *Lactobacillus aquaticus* se ha aislado de un estanque de agua dulce en Corea (Song *et al.*, 2007; Mañes-Lazaro *et al.*, 2009) y, recientemente, Vela *et al.* (2008) han descrito una nueva especie de *Lactobacillus*, denominada *Lactobacillus ceti*, aislada de los pulmones y el hígado de un tipo de ballena denominado ballenato de Cuvier (*Ziphius cavirostris*).

Tabla II.21. Especies del género *Lactobacillus* aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca.

<i>Lactobacillus</i> spp. aisladas	Especie acuática	Referencia
<i>Lactobacillus lactis</i>	Bacalao	Lauzon <i>et al.</i> (2010)
	<i>Takifugu niphobles</i> ^a	Itoi <i>et al.</i> (2008)
	Bagre de canal	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpa común	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpa plateada	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpín	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Sábalo	Silva <i>et al.</i> (2005)
	Salmónidos	Balcázar <i>et al.</i> (2007a)
<i>Lactobacillus sakei</i>	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Carpa común	Hagi y Hoshino (2009)
	Carpa común	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Perca	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Anguila europea	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Peces de agua dulce ^b	González <i>et al.</i> (2000)
	Salmónidos	Balcázar <i>et al.</i> (2007a)
	Salmón del Atlántico	Askarian <i>et al.</i> (2011)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Pez gato	Ogunshe y Olabode (2009)
	Tilapia del Nilo	Jatoba <i>et al.</i> (2008)
	Anguila europea	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Peces de agua dulce	González <i>et al.</i> (2000)
	Salmónidos	Balcázar <i>et al.</i> (2007a)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Esturión	Askarian <i>et al.</i> (2009)
	Carpa común	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpa china	Han <i>et al.</i> (2010)
	Carpín	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Peces de agua dulce ^b	González <i>et al.</i> (2000)
	Salmónidos	Balcázar <i>et al.</i> (2007a)
<i>Lactobacillus raffinolactis</i>	Bagre de canal	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpa común	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpa plateada	Hagi <i>et al.</i> (2004)
	Carpín	Hagi <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Pez gato	Ogunshe y Olabode (2009)
	Pez gato	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Tilapia del Nilo	Jatoba <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Almeja	Bourouni <i>et al.</i> (2007)
	Lubina europea	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
	Pez gato	Ogunshe y Olabode (2009)

Tabla II.21. Continuación.

<i>Lactobacillus</i> spp. aisladas	Especie acuática	Referencia
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Anguila europea	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Escardinio	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus coryneformis</i>	Carpa común	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Perca	Bucio <i>et al.</i> (2006)
	Anguila europea	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
	Catfish	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
	Escardinio	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i>	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Pez gato	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus oris</i>	Esturión	Ghanbari <i>et al.</i> (2009)
	Perca	Bucio <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Carpa china	Han <i>et al.</i> (2010)
	Salmón del Atlántico	Hovda <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Ostras	Lee <i>et al.</i> (2010)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lubina europea	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus lindneri</i>	Lubina europea	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	Lubina europea	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Pez gato	Ogunshe y Olabode (2009)
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	Carpa común	Hagi y Hoshino (2009)
<i>Lactobacillus mali</i>	Peces de agua dulce ^b	González <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus sharpae</i>	Peces de agua dulce ^b	González <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Salmón del Atlántico	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus aviarius</i>	Salmón del Atlántico	Liu <i>et al.</i> (2008)

^a*Takifugu niphobles* es un pez de mar y clima templado que se encuentra en Asia (Japón, sur de Corea y Vietnam). No existe una denominación en español para esta especie de pescado. ^bGonzález *et al.* (1999) aislaron microbiota láctica de diversos peces de agua dulce (trucha común, trucha arcoíris y lucio).

II.4.2.2. LACTOBACILOS Y SALUD

II.4.2.2.1. CULTIVOS PROBIÓTICOS

La presencia natural de lactobacilos en el tracto digestivo de animales y humanos ha sido considerada históricamente como beneficiosa para el hospedador, y, más recientemente, su asociación con la cavidad oral, la vagina y el tracto urogenital en humanos ha llevado a que actualmente el género *Lactobacillus* constituya uno de los principales empleados como probióticos (Holzapfel *et al.*, 2001; Hammes y Hertel, 2006; Ljungh y Wadström, 2006; Pot y Tsakalidou, 2009; Maldonado-Galeano *et al.*, 2010; Meurman y Stamatova, 2012; Stolaki *et al.*, 2012). Se puede considerar que existen dos vías principales para introducir células vivas con efecto probiótico en el organismo: (i) los alimentos, ya que de forma natural o añadidos intencionadamente los probióticos se pueden encontrar en productos lácteos fermentados (*e.g.*, yogur, leche y queso), vegetales fermentados (*e.g.*, aceitunas, *sauerkraut* y cereales), productos cárnicos y pescados fermentados y bebidas alcohólicas artesanales; (ii) suplementos alimenticios o medicamentos que contienen una o más cepas probióticas que se administran como preparados farmacéuticos en forma de cápsulas, pastillas, polvos o gránulos (Holzapfel y Schillinger, 2002; Franz *et al.*, 2010; Gueimonde *et al.*, 2012). Actualmente existen en el mercado numerosos alimentos así como medicamentos y complementos alimenticios que contienen cepas de *Lactobacillus* spp. (Gueimonde *et al.*, 2012). A este respecto, en la Tabla II.22 se recogen las preparaciones probióticas formuladas a base de cepas del género *Lactobacillus* registradas como medicamentos, así como algunos de los complementos alimenticios que se pueden encontrar actualmente en el mercado español.

Tabla II.22. Medicamentos y complementos alimenticios formulados con cepas del género *Lactobacillus* como principio activo comercializados en el mercado español.

Nombre comercial/ Laboratorio	Cepa(s)	Forma farmacéutica	Indicaciones terapéuticas/ Observaciones	CN ^a
Medicamentos		Indicaciones terapéuticas		
CASENFILUS®/ Casen Fleet	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Polvo para suspensión oral	Tratamiento sintomático de las diarreas inespecíficas. Prevención y tratamiento sintomático de los procesos diarreicos causados por la destrucción de la microbiota intestinal debido a la administración de antibióticos.	777102
INFLORAN BERNA®/ Desma	<i>Lb. acidophilus</i> y <i>Lactobacillus biphidus</i>	Cápsulas	Tratamiento sintomático de las diarreas inespecíficas.	694919
LACTEOL®/ Ramón Sala	<i>Lb. acidophilus</i>	Cápsulas/ Polvo para suspensión oral	Tratamiento sintomático de las diarreas inespecíficas y prevención y tratamiento sintomático de los procesos diarreicos causados por la destrucción de la microbiota intestinal, debido a la administración de antibióticos.	779124/ 779116

Tabla II.22. Continuación.

Nombre comercial/ Laboratorio	Cepa(s)	Forma farmacéutica	Indicaciones terapéuticas/ Observaciones	CN
Medicamentos		Indicaciones terapéuticas		
LACTOFILUS®/ Juventus	<i>Lb. acidophilus</i>	Polvo para suspensión oral	Tratamientos de los procesos diarreicos agudos. Prevención y tratamiento de las diarreas producidas por la administración de antibióticos.	777086
Complementos alimenticios		Observaciones		
LACTOSPORE®/ Farmasierra LAB	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	Comprimidos	Actúa sobre la microbiota intestinal.	265131
BIORAL SUERO®/ Casen	<i>Lactobacillus reuteri</i> + electrolitos	Solución en <i>brick</i>	Aumenta el aporte de agua y sales minerales al organismo.	399204
ACTIVECOMPLEX FLORA®/ Pharma Nord	<i>Lb. acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	Cápsulas	Diarrea, microbiota intestinal, efectos positivos sobre el afta vaginal, los problemas de absorción y el colon irritable	344502
PEARLS-WINTER®/ DHU	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i> y <i>Bifidobacterium longum</i>	Perlas	Restablecimiento de la microbiota intestinal	158223
ARKOPROBIOTICS FLORAIMTIN®/ Arkopharma	<i>Lb. acidophilus</i> La-14	Cápsulas	Restauración de la microbiota vaginal	160933
AXIDOPHILUS® JUNIOR/Ciencia y Naturaleza	<i>Lactobacillus casei</i> LC-11 y <i>B. lactis</i> BI-04	Sobres	Restablecimiento de la microbiota intestinal	155305
BACILAC INSTANT®/ Galiux Pharma	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	<i>Sticks</i> (gránulos)	Restablecimiento de la microbiota intestinal	159332
LACTIBIANE IKI PILEJE®/Pileje SLU	<i>Lb. acidophilus</i> LA201, <i>Lactobacillus salivarius</i> LA302 y <i>B. lactis</i> LA304	Sobres	Contribuye a reforzar la microbiota intestinal, facilita la asimilación digestiva y refuerza el sistema inmunitario	159738
GUM PERIOBALANCE®/ Sunstar	<i>Lb. reuteri</i> prodentis	Tabletas	Higiene bucal	305356
LACTOFLORA®/ Stada	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP-115, <i>Lb. acidophilus</i> La-14, <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC-37 y <i>B. lactis</i>	Viales	Restablece y reequilibra la microbiota intestinal dañada en procesos diarreicos asociados a terapia antibiótica, infecciones, intolerancias y alergias alimentarias	154565
OENOBIOLO CONFORT DIGESTIV®/Oenobiol	<i>Lb. plantarum</i> LP01 y <i>Bifidobacterium breve</i> Br03	Cápsulas	Restablecimiento de la microbiota intestinal	158762
ORSADIN PROBIOTIC MONODOSIS®/ Gynea LAB	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Sobres	Contribuye a regenerar la microbiota intestinal	233462

Tabla II.22. Continuación.

Nombre comercial/ Laboratorio	Cepa(s)	Forma farmacéutica	Indicaciones terapéuticas/ Observaciones	CN
Complementos alimenticios			Observaciones	
OTC MASTER DYNAMIX L CASEI®/ Pharmadiet OTC	<i>Lb. sporogenes</i> y <i>Lb. casei</i>	Barritas	Indicado para un equilibrio óptimo de la microbiota intestinal, aumentar las defensas y estimular el sistema inmunológico	161101
PRIMACOL LACTOBACILLUS AB LIFE®/Lacer	<i>Lb. plantarum</i>	Cápsulas	Contribuye a mantener niveles adecuados de colesterol	163058
REUTERI GOTAS®/ Casen	<i>Lb. reuteri</i> protectis	Gotas	Mantenimiento de la microbiota intestinal	161433
DEFENS®/ Soria Nat	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>Lb. rhamnosus</i>	Cápsula+Vial	Restablecimiento de la microbiota intestinal	161747
YOBALX BALANCE®/ Bayer Hispania	<i>Lb. gasseri</i> PA16/8, <i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i>	Polvo para suspensión oral	Mantenimiento de la salud intestinal y regulación de la digestión	160409
Productos sanitarios (RD 1591/2009)^b			Observaciones	
LACTONORM®/ LAB Sintexline	<i>Lb. acidophilus</i>	Cápsulas vaginales	Restablece el equilibrio de la microbiota vaginal	154973

^aEl Código Nacional (CN) es un sistema de identificación rápido o herramienta informática que tiene por objeto ayudar y facilitar la gestión de las oficinas de farmacia en la adquisición de los productos de farmacia o parafarmacia que se encuentran en el mercado nacional mediante el tratamiento informático de los productos. Este código es asignado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos a todos aquellos productos que se ajusten a lo dispuesto en la legislación vigente en la materia. ^bReal Decreto (RD) 1591/2009, de 16 de octubre, por el que se regulan los productos sanitarios.

A pesar de que el mecanismo de acción de los probióticos todavía no es del todo bien conocido, su uso se ha asociado con un gran número de efectos beneficiosos para la salud, como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la hipertensión y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales (Gill *et al.*, 2012; Lyra *et al.*, 2012). A este respecto, la mayor parte de *Lactobacillus* spp. empleados como probióticos pertenecen al grupo *Lb. acidophilus* (Tabla II.21), principalmente a las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* y *Lb. salivarius*. La especie *Lb. rhamnosus*, perteneciente al grupo *Lb. casei* (Tabla II.21) es ampliamente utilizada como probiótico, aunque este microorganismo también se ha asociado esporádicamente con infecciones clínicas humanas (sección II.4.4) (Vancanneyt *et al.*, 2006; Pot y Tsakalidou, 2009). Por otra parte, dentro del grupo *Lb. buchnerii* se encuentran las especies *Lb. kefir* y *Lb. parakefir*, aisladas del kéfir, producto del que se conocen sus beneficios para la salud. A pesar de todo lo expuesto, conviene destacar que no debe asumirse que todos los lactobacilos en particular, o que todas las bacterias lácticas en general y bifidobacterias poseen propiedades beneficiosas para la salud, siendo necesario estudios detallados caso por caso para establecer el carácter probiótico de una cepa determinada (Donohue y Gueimonde, 2012).

Por otra parte, la seguridad de los probióticos es un aspecto importante que preocupa tanto a las autoridades competentes como a los consumidores (Franz *et al.*, 2010; Sanders *et al.*, 2010; Salminen y von Wright, 2012), y a este respecto, diversas organizaciones han dirigido iniciativas relativas a este aspecto. En Estados Unidos, los probióticos consumidos como alimentos o en forma de complementos alimenticios deben estar reconocidos como seguros, es decir, gozar del estatus GRAS, por la FDA. Por otra parte, la Federación Internacional de Productos Lácteos (IDF, del inglés *International Dairy Federation*) y la Asociación Europea de Cultivos para Alimentos y Alimentación (EFFCA, del inglés *European Food and Feed Culture Association*) han elaborado conjuntamente un inventario de microorganismos con una historia documentada de uso seguro en alimentación (Mogenesen *et al.*, 2002; Seifert y Mogensén, 2002; Donohue y Gueimonde, 2012; Salminen y von Wright, 2012). Más recientemente, la EFSA ha elaborado una lista de los microorganismos con estatus QPS (Tabla II.23), proporcionando así un sistema genérico de asesoramiento de la seguridad de los microorganismos introducidos deliberadamente en la cadena alimentaria. Este calificativo se establece principalmente con base en cuatro pilares: (i) establecimiento de la identidad taxonómica; (ii) cuerpo de conocimiento; (iii) posible patogenicidad, y (iv) empleo final, lo cual permite que cualquier microorganismo cuya identidad se pueda determinar inequívocamente, y se garantice su pertenencia a un grupo QPS, se aplique en la producción de alimentos con el único requerimiento de demostrar la ausencia de determinantes génicos transmisibles de resistencia a antibióticos (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2008a, 2011; Franz *et al.*, 2010; Donohue y Gueimonde, 2012; Salminen y von Wright, 2012).

II.4.2.2.1.1. Cultivos probióticos en acuicultura

La aplicación de bacterias lácticas como cultivos probióticos o cultivos protectores en acuicultura, es un área reciente que se encuentra en rápido crecimiento (Ringø y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; Ringø, 2004; Ringø *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield y Zhou, 2011; Muñoz-Atienza *et al.*, 2013). La principal razón que motivó la búsqueda de probióticos en acuicultura fue la necesidad de disponer de métodos profilácticos para luchar con los problemas de baja supervivencia encontrados en diferentes etapas de los cultivos intensivos. A este respecto, la proliferación de microorganismos patógenos y oportunistas causa un escaso crecimiento larval y altas tasas de mortalidad (Munro *et al.*, 1995); como consecuencia, la disponibilidad y calidad de ejemplares juveniles es el mayor cuello de botella de muchas de las especies cultivadas en acuicultura. Los antibióticos han sido usados frecuentemente para la prevención y el control de enfermedades en acuicultura, especialmente en las primeras fases de crecimiento, cuando todavía no es posible la aplicación de vacunas; sin embargo, la problemática de la aparición de resistencias a estos compuestos y los problemas medioambientales derivados de su utilización ha llevado a la búsqueda de estrategias alternativas a la quimioterapia que resulten eficaces y seguras para los peces, el hombre y el medio ambiente, entre los que destaca la aplicación de microorganismos probióticos, especialmente durante la etapa larvaria y de alevinaje (Verschuere *et al.*, 2000; Serrano, 2005).

Tabla II.23. Lista de bacterias lácticas con estatus QPS propuesta por la EFSA ^a.

Microorganismos Gram-positivos no esporulados			Condiciones ^b
Género <i>Lactobacillus</i>			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	Ninguna
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus rhammosus</i>	
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>		
Género <i>Lactococcus</i>			
<i>Lactococcus lactis</i>			Ninguna
Género <i>Leuconostoc</i>			
<i>Leuconostoc citreum</i>			Ninguna
<i>Leuconostoc lactis</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
Género <i>Oenococcus</i>			
<i>Oenococcus oeni</i>			Ninguna
Género <i>Pediococcus</i>			
<i>Pediococcus acidilactici</i>			Ninguna
<i>Pediococcus dextrinicus</i>			
<i>Pediococcus pentosaceus</i>			
Género <i>Streptococcus</i>			
<i>Streptococcus thermophilus</i>			Ninguna

^aEsta lista de microorganismos QPS se actualiza frecuentemente como consecuencia de las evaluaciones periódicas de seguridad.

^bPara todas las unidades taxonómicas bacterianas la condición genérica es que las cepas no deben albergar ningún gen de resistencia adquirida a antibióticos clínicamente relevantes; no obstante, para algunas de ellas se establecen, además, otro tipo de consideraciones. Fuente: EFSA (2010, 2011).

En los animales acuáticos, las rutas para la entrada de microorganismos patógenos difieren de las de los humanos y animales terrestres en que, además del tracto gastrointestinal, existen otras rutas de acceso como son las agallas y la piel (Ringø *et al.*, 2007; Engelsens *et al.*, 2008). En consecuencia, la definición de cultivo probiótico propuesta por Verschuere *et al.* (2000) es más adecuada para su aplicación en acuicultura, ya que considera como tal a un cultivo microbiano que: (i) beneficia al hospedador mediante una modificación de la microbiota asociada a su ambiente o al propio hospedador; (ii) mejora su resistencia frente a las enfermedades; (iii) asegura una mejora en su alimentación, y/o incrementa el valor nutricional de su alimento, y (iv) mejora la calidad del ambiente en el que se encuentra. Por lo tanto, la administración de los probióticos al hospedador puede realizarse incluyéndolos en la dieta o adicionándolos al agua en el que éste se desarrolla (Gatesoupe, 1999). Conviene destacar que muchos de los probióticos usados en acuicultura han sido seleccionados con base en su eficacia demostrada previamente en humanos y animales y que actualmente existe un número reducido de productos comerciales que alegan propiedades probióticas para los peces y el medio acuático que contengan cepas

del género *Lactobacillus* (Tabla II.24) (Azad y Ai-Marzouk, 2008). Debido a su eficacia y seguridad demostrada en cerdos y gallinas, BACTOCELL® es el primer aditivo, y, hasta la fecha, el único autorizado en Europa para el cultivo intensivo de salmónidos y camarones.

Tabla II.24. Preparaciones probióticas comerciales para la acuicultura formuladas con cepas del género *Lactobacillus* y otras bacterias lácticas.

Producto/ Compañía	Aplicación	Beneficios	Microorganismos
PRO-3000® series/ Aqua-in-tech	Aditivo para el agua o el pienso	Reduce el estrés y mejora la tasa de supervivencia	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALCHEM POSEIDON®/ Alchem Korea	Aditivo para el agua o el pienso	Mejora la inmunidad no específica	<i>B. subtilis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Sc. cerevisiae</i>
EFINOL PT®/ Bentoli Inc.	Cultivo microbiano para gambas y peces de estanque; para recubrimiento del pienso (<i>feed coating</i>)	Reduce el estrés, minimiza la mortalidad durante la aparición de enfermedades. Mejora la uniformidad y rendimiento de las especies acuáticas, ayuda a mantener un balance microbiano favorable y las condiciones de la calidad del agua en estanques.	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> y <i>Sc. cerevisiae</i>
EFINOL® L/ Bentoli Inc.	Aditivo para el agua	Reduce el estrés, mejora las tasas de supervivencia y produce larvas más fuertes y sanas	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> y <i>Sc. cerevisiae</i>
SORBIFLORE®/ Danisco France SAS	Aditivo para el pienso	Reduce la malformación en juveniles de lubina, mejora su supervivencia y activa las enzimas digestivas	<i>Lactobacillus farciminis</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
BACTOCELL®/ Lallemand	Aditivo para el pienso para salmónidos y camarones	Mejora la producción de salmónidos y camarones	<i>Pediococcus acidilactici</i>
TOARAZE®/ TOA Pharmaceutical Company of Japan	Mezclado en el pienso para anguilas y gambas	Inhibe patógenos en el tracto gastrointestinal, mejora la efectividad del alimento, la calidad del agua y el crecimiento general. Mejora el rendimiento de la acuicultura	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Cl. butyricum</i> y <i>Bacillus mesentericus</i>
CERNIVET LBC ME10®/ Cerbios-Pharma	Aditivo microbiano granulable	Estabiliza la microbiota intestinal, basado en ingredientes activos probióticos, aumenta la resistencia a edwardsiellosis en anguilas	<i>Enterococcus faecium</i>

Adaptada de Lauzon y Ringø (2012).

II.4.3. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Lactobacillus*

Hasta la fecha se han aislado numerosas cepas de lactobacilos productoras de bacteriocinas, principalmente de las especies *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, pero también *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. salivarius*, *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. amylovorus*, *Lb. brevis*, *Lb. reuteri* y *Lb. rhamnosus* a partir de una gran variedad de alimentos, entre los que se incluyen, la leche y productos lácteos (West y Warner, 1988; Joerger y Klaenhammer, 1990; González *et al.*, 1994; Kanatani *et al.*, 1995; Lozo *et al.*, 2007; Kojic *et al.*, 2010; Broadvent *et al.*, 2012), los embutidos crudos curados y otros productos cárnicos (Mortvedt *et al.*, 1991; Tichaczek *et al.*, 1993, 1994; Holck *et al.*, 1992, 1994a; Samelis *et al.*, 1994; Hugas *et al.*, 1995; Rekhif *et al.*, 1995; Kaiser y Monteville, 1996; Aymerich *et al.*, 2000a; Mathiesen *et al.*, 2005; Xiraphi *et al.*, 2006; Cocolin y Rantsiou, 2007; Ghalfi *et al.*, 2010), los animales de granja (Barret *et al.*, 2007; Forde *et al.*, 2011; Svetoch *et al.*, 2011; Messaoudi *et al.*, 2012), los productos de la pesca (Todorov *et al.*, 2011a, b), la fruta (Kato *et al.*, 1994), los vegetales y cereales frescos y fermentados (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Arihara *et al.*, 1996; Diep *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2010; Venugopal *et al.*, 2011; Hurtado *et al.*, 2011a, b), el vino (Holo *et al.*, 2001) y los licores (Contreras *et al.*, 1997) (Tabla II.25) por lo que la bacteriocinogenicidad constituye un rasgo fenotípico muy común entre los lactobacilos de origen alimentario. Asimismo, se han aislado lactobacilos productores de bacteriocinas de preparaciones probióticas (Flynn *et al.*, 2002; Tsapieva *et al.*, 2011), contenido gastrointestinal de niños y adultos (Muriana y Klaenhammer, 1987; Fremaux *et al.*, 1993; Dimitrijevic *et al.*, 2009; O'Shea *et al.*, 2011), vagina humana (Aroutcheva *et al.*, 2001; Vera Pingitore *et al.*, 2009) y heces infantiles (Kawai *et al.*, 1998; Majhenic *et al.*, 2004) (Tabla II.25).

Tabla II.25. Bacteriocinas producidas por cepas del género *Lactobacillus*.

Clase/ Bacteriocina	Subclase	Cepa productora	Fuente	Referencia original
Clase I				
Lactocina S ^a	Ia1	<i>Lb. sakei</i> L45	Salchichas	Mortvedt <i>et al.</i> (1991)
Plantaricina W (α y β)	Ia2	<i>Lb. plantarum</i> LMG 2379	Vino	Holo <i>et al.</i> (2001)
Plantaricina C	Ia2	<i>Lb. plantarum</i> LL441	Queso cabrales	González <i>et al.</i> (1994)
Clase II				
Sakacina P ^b	IIa	<i>Lb. sakei</i> LTH673	Embutido curado	Tichaczek <i>et al.</i> (1994)
Sakacina P (variante) ^c	IIa	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	Carne fermentada	Cocolin y Rantsiou (2007)
Sakacina A ^d	IIa	<i>Lb. sakei</i> Lb706	Carne	Holck <i>et al.</i> (1992)
Sakacina Q ^e	IIe	<i>Lb. sakei</i> LTH673	Embutido curado	Mathiesen <i>et al.</i> (2005)
Sakacina Q (variante) ^f	IIe	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	Carne fermentada	Cocolin y Rantsiou (2007)
Sakacina G ^g	IIa	<i>Lb. sakei</i> 2512	Origen alimentario	Simon <i>et al.</i> (2002)
Sakacina B	-	<i>Lb. sakei</i> 251	Embutido curado	Samelis <i>et al.</i> (1994)
Sakacina T (SakTa y SakT β) ^h	IIb	<i>Lb. sakei</i> CTC372	Salchichas	Aymerich <i>et al.</i> (2000)
Sakacina X ⁱ	IIa	<i>Lb. sakei</i> 5	Malta	Vaughan <i>et al.</i> (2003)

Tabla II.25. Continuación.

Clase/ Bacteriocina	Subclase	Cepa productora	Fuente	Referencia original
Bavaricina A	IIa	<i>Lb. sakei</i> MI1401	<i>Sourdough</i>	Larsen <i>et al.</i> (1993)
Bavaricina MN	IIa	<i>Lb. sakei</i> MN	Carne (vacuno)	Kaiser y Monteville (1996)
Curvaticina L442	IIa	<i>Lb. curvatus</i> L442	Embutido curado	Xiraphi <i>et al.</i> (2006)
Curvalicina 28a	-	<i>Lb. curvatus</i> CWBI-B28	Carne	Ghalfi <i>et al.</i> (2010)
Curvalicina 28b	-	<i>Lb. curvatus</i> CWBI-B28	Carne	Ghalfi <i>et al.</i> (2010)
Curvalicina 28c	-	<i>Lb. curvatus</i> CWBI-B28	Carne	Ghalfi <i>et al.</i> (2010)
Lactocina 705 (Lac705 α y Lac705 β)	IIb	<i>Lb. curvatus</i> CRL705	Embutido curado	Castellano <i>et al.</i> (2003)
Curvaticina 13	IIa	<i>Lb. curvatus</i> SB13	Salchichas	Sudirman <i>et al.</i> (1993)
Curvaticina FS47	-	<i>Lb. curvatus</i> FS47	Carne	Garver y Muriana (1994)
Glicocina F	-	<i>Lb. plantarum</i> KW30	Producto de maíz fermentado	Venugopal <i>et al.</i> (2011)
Pediocina PA-1 ^j	IIa	<i>Lb. plantarum</i> WHE92	Queso	Ennahar <i>et al.</i> (1996)
Plantaricina A	-	<i>Lb. plantarum</i> C11	Pepino fermentado	Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1993)
Plantaricinas J/K (PlnJ y PlnK)	IIb	<i>Lb. plantarum</i> C11	Pepino fermentado	Diep <i>et al.</i> (1996)
Plantaricinas E/F (PlnE y PlnF)	IIb	<i>Lb. plantarum</i> C11	Pepino fermentado	Diep <i>et al.</i> (1996)
Plantaricina S (Pls α y Pls β)	IIb	<i>Lb. plantarum</i> LPCO10	Aceitunas verdes	Stephens <i>et al.</i> (1998)
Plantaricina T	-	<i>Lb. plantarum</i> LPCO10	Aceitunas verdes	Jiménez-Díaz <i>et al.</i> (1993)
Plantaricina NC8 (PLNC8 α y PLNC8 β)	IIb	<i>Lb. plantarum</i> NC8	Ensilado	Maldonado <i>et al.</i> (2003)
Plantaricina C19	IIa	<i>Lb. plantarum</i> C19	Pepino fermentado	Atrih <i>et al.</i> (2001)
Plantaricina 423	IIa	<i>Lb. plantarum</i> 423	<i>Sorghum</i> (cerveza)	van Reenen <i>et al.</i> (2003)
Plantaricina 1.25 β	-	<i>Lb. plantarum</i> TMW1.25	Salchichas fermentadas	Remiger <i>et al.</i> (1999)
Plantaricina ASM1	-	<i>Lb. plantarum</i> A-1	Pan de maíz	Hata <i>et al.</i> (2010)
Plantaricina SA6	-	<i>Lb. plantarum</i> SA6	Salchichas fermentadas	Rekhif <i>et al.</i> (1995)
Plantaricina B	-	<i>Lb. plantarum</i> NCDO1193	Origen lácteo	West y Warner (1988)
Plantaricina D	-	<i>Lb. plantarum</i> BFE 905	Ensalada <i>Waldorf</i>	Franz <i>et al.</i> (1998)
Plantaricina 149	-	<i>Lb. plantarum</i> NRIC 149	Piña	Kato <i>et al.</i> (1994)
Plantaricina LC74	-	<i>Lb. plantarum</i> LC74	Leche cruda de cabra	Rekhif <i>et al.</i> (1994)
Plantaricina MG	-	<i>Lb. plantarum</i> KLDS1.0391	<i>Jiaoke</i>	Gong <i>et al.</i> (2010)
Plantaricina UG1	-	<i>Lb. plantarum</i> UG1	Embutido	Enan <i>et al.</i> (1996)
Plantaricina ST31	-	<i>Lb. plantarum</i> ST31	<i>Sourdough</i>	Todorov <i>et al.</i> (1999)
Bacteriocina ST28MS	-	<i>Lb. plantarum</i> ST28MS	Melaza	Todorov y Dicks (2005)
Bacteriocina ST26MS	-	<i>Lb. plantarum</i> ST26MS	Melaza	Todorov y Dicks (2005)
Plantaricina F	-	<i>Lb. plantarum</i> BF001	Filetes de pez gato deteriorados	Fricourt <i>et al.</i> (1994)
Bacteriocina L-1077	IIa	<i>Lb. salivarius</i> L-1077	Intestino (pollos de engorde)	Svetoch <i>et al.</i> (2011)
Salivaricina P (Sln1 y Sln2)	IIb	<i>Lb. salivarius</i> DPC6005	Intestino (cerdo)	Barret <i>et al.</i> (2007)
Salivaricina ABP-118 (Abp118 α y Abp118 β)	IIb	<i>Lb. salivarius</i> UCC118	Intestino (probiótico humano)	Flynn <i>et al.</i> (2002)
Salivaricina B	-	<i>Lb. salivarius</i> M7	Origen alimentario	ten Brinck <i>et al.</i> (1994)
Salivaricina L	IId	<i>Lb. salivarius</i> DPC6488	Intestino (neonato)	O'Shea <i>et al.</i> (2011)
Salivaricina T (SalT α y SalT β)	IIb	<i>Lb. salivarius</i> DPC6488	Intestino (neonato)	O'Shea <i>et al.</i> (2011)

Tabla II.25. Continuación.

Clase/ Bacteriocina	Subclase	Cepa productora	Fuente	Referencia original
Salivaricin CLR 1328 (Sal α y Sal β)	-	<i>Lb. salivarius</i> CLR1328	Vagina (humana)	Vera Pingitore <i>et al.</i> (2009)
Salivacina 140	-	<i>Lb. salivarius</i> T140	Hierba	Arihara <i>et al.</i> (1996)
Bacteriocina SMXD51	-	<i>Lb. salivarius</i> SMXD51	Heces (pollo)	Messaoudi <i>et al.</i> (2012)
Acidocina LF221 (LF221A y LF221B) ^k	IIb	<i>Lb. gasseri</i> LF221	Heces (niño)	Majhenic <i>et al.</i> (2004)
Gasericina T (GatA y GatX)	IIb	<i>Lb. gasseri</i> SBT2055	Heces (humanas)	Kawai <i>et al.</i> (2000)
Gasericina A ^l	IId	<i>Lb. gasseri</i> LA39	Heces (niño)	Kawai <i>et al.</i> (1998)
Acidocina J1132 (J1132 α y J1132 β)	IIb	<i>Lb. acidophilus</i> JCM1132	Heces (humanas)	Tahara <i>et al.</i> (1996)
Acidocina 8912	-	<i>Lb. acidophilus</i> TK8912	Origen lácteo	Tahara <i>et al.</i> (1992)
Acidocina M	-	<i>Lb. acidophilus</i> TK8912	Origen lácteo	Kanatani <i>et al.</i> (1995)
Acidocina A	IIa	<i>Lb. acidophilus</i> TK9201	Leche fermentada (starter)	Kanatani <i>et al.</i> (1995)
Acidocina B	-	<i>Lb. acidophilus</i> M46	Origen alimentario	Leer <i>et al.</i> (1995)
Lactacina B	-	<i>Lb. acidophilus</i> N2	Origen alimentario	Barefoot y Klaenhammer (1983)
Lactocina 27	-	<i>Lb. helveticus</i> LP27	Origen humano y animal	Upreti y Hinsdill (1973)
Helveticina V-1829	-	<i>Lb. helveticus</i> 1829	Origen alimentario	Vaughan <i>et al.</i> (1992)
Bacteriocina	-	<i>Lb. helveticus</i> CNRZ450	Origen lácteo	Thompson <i>et al.</i> (1996)
Lactocina 705	IIb	<i>Lb. paracasei</i> CRL 705	Carne	Vignolo <i>et al.</i> (1996)
Bacteriocina SJ	-	<i>Lb. paracasei</i> BGSJ2-8	Queso casero	Lozo <i>et al.</i> (2007)
Acidocina 8912	-	<i>Lb. paracasei</i> BGSJ2-8	Queso casero	Kojic <i>et al.</i> (2010)
Lactacina F (LafA y LafX) ^m	IIb	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088	Intestino (humano)	Fremaux <i>et al.</i> (1993)
Lactobina A ⁿ	IIb	<i>Lb. amylovorus</i> LMG P-13139	Licor de maíz	Contreras <i>et al.</i> (1997)
Brevicina 27	-	<i>Lb. brevis</i> SB27	Salchichas	Benoit <i>et al.</i> (1997)
Rhamnosina A	IId	<i>Lb. rhamnosus</i> 68	Microbiota intestinal (humana)	Dimitrijevic <i>et al.</i> (2009)
Lactocina 160	-	<i>Lb. rhamnosus</i> 160	Vagina sana (humana)	Aroutcheva <i>et al.</i> (2001)
Bacteriocina	IIa	<i>Lb. ruminis</i> ATCC 27782	Intestino (bovino y humano)	Forde <i>et al.</i> (2011)
Plantaricina S	-	<i>Lb. pentosus</i> B96	Aceitunas	Hurtado <i>et al.</i> (2011a)
Bacteriocina	IId	<i>Lb. casei</i> UW4	Queso	Broadvent <i>et al.</i> (2012)
Clase III				
Helveticina J ^o	-	<i>Lb. helveticus</i> NCDO481	Origen lácteo	Joerger y Klaenhammer (1990)

Entre las bacteriocinas caracterizadas con idéntica secuencia aminoacídica a las que se señalan con una letra en superíndice se incluyen:

^aSakacina M/lactocina S de *Lb. sakei* 148 (Sobrinho *et al.*, 1992; Skaugen *et al.*, 1997). ^bSakacina 674 de *Lb. sakei* 674 (Holck *et al.*, 1994a).

^cVariante de la sakacina P de *Lb. curvatus* L442 (Cocolin y Rantsiou, 2007). ^dCurvacina A de *Lb. curvatus* LTH1174 (Tichaczek *et al.*, 1993) y

sakacina K de *Lb. sakei* CTC 494 (Hugas *et al.*, 1995). ^eSakacina Q de *Lb. sakei* Lb674 (Mathiesen *et al.*, 2005) y sakacina Q de *Lb. curvatus*

CRL705 (Hebert *et al.*, 2012). ^fVariante de la sakacina Q de *Lb. curvatus* L442 (Cocolin y Rantsiou, 2007) y *Lb. curvatus* CRL705 (Hebert *et al.*, 2012).

^gBacteriocina R1333 de *Lb. sakei* R1333 (Todorov *et al.*, 2011a). ^hSakacina T(SakTa y SakT β) de *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003),

Lb. curvatus 2711 (Héquet *et al.*, 2007) y *Lb. curvatus* CRL705 (Hebert *et al.*, 2012). ⁱSakacina X de *Lb. curvatus* 2711 (Héquet *et al.*, 2007) y

Lb. curvatus CRL705 (Hebert *et al.*, 2012). ^jPediocina PA-1 de *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 (Marugg *et al.*, 1992) y

Pediococcus parvulus ATO34 (Bennik *et al.*, 1997). ^kGasericina K7 (K7A y K7B) de *Lb. gasseri* K7 (Zoric Petemel *et al.*, 2010). ^lReuterina

6 de *Lb. reuteri* LA6 (Kawai *et al.*, 2001). ^mLactacina F de *Lb. acidophilus* 30SC (Oh *et al.*, 2011). ⁿAmylovorina L471 de *Lb. amylovorus*

DCE471 (de Vuyst *et al.*, 2004). ^oHelveticina J de *Lb. acidophilus* 30SC (Oh *et al.*, 2011).

De forma general, el espectro de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por los lactobacilos es amplio e incluye microorganismos alterantes y patógenos como *L. monocytogenes*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *Br. thermosphacta*, además de otros *Lactobacillus* y bacterias lácticas como *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Carnobacterium* spp. y *Lactococcus* spp. (Messenes y de Vuyst, 2002; Drider *et al.*, 2006; Todorov, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Nissen-Meyer *et al.*, 2010; Pérez, 2012). Además, a pesar de que las bacteriocinas suelen ser solo activas frente a bacterias Gram-positivas, se ha descrito que las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* spp. SakA (Schillinger y Lücke, 1989), plantaricina MG (Gong *et al.*, 2010), salivacina T140 (Arihara *et al.*, 1996), bacteriocinas ST26MS y ST28MS (Todorov y Dicks, 2005b), salivaricina CRL1328 (Ocaña *et al.*, 1999; Vera Pingitore *et al.*, 2009), bacteriocina L-1077 (Svetoch *et al.*, 2011) y bacteriocina SMXD51 (Messaoudi *et al.*, 2012) también inhiben a bacterias Gram-negativas.

La variedad de bacteriocinas producidas por lactobacilos es muy amplia, habiéndose caracterizado bioquímica y genéticamente hasta la fecha más de 50 diferentes (Tabla II.25). La mayoría de ellas son péptidos antimicrobianos de bajo tamaño molecular, termoestables y sin aminoácidos modificados postraduccionalmente, que pertenecen a la clase II (no lantibióticos) (sección II.3.3.1), y, en particular, a la: (i) subclase IIa (tipo pediocina) como SakP (Tichaczek *et al.*, 1994), SakX (Vaughan *et al.*, 2003), SakA (Holck *et al.*, 1992) o curvaticina L442 (Xiraphi *et al.*, 2006); (ii) subclase IIb (sistemas de dos péptidos) como SakT (SakT α y SakT β) (Aymerich *et al.*, 2000a), Lac705 (Lac705 α y Lac705 β) (Castellano *et al.*, 2003), plantaricinas E/F (PlnE y PlnF) y J/K (PlnJ y PlnK) (Diep *et al.*, 1996) y salivaricina P (Sln1 y Sln2) (Barret *et al.*, 2007); (iii) subclase IIc (con estructura cíclica) como gassericina A (Kawai *et al.*, 1998), salivaricina L (O'Shea *et al.*, 2011) y rhamnosina A (Dimitrijevic *et al.*, 2009), y (iv) subclase IId como SakQ (Mathiesen *et al.*, 2005; Cocolin y Rantsiou, 2007). No obstante, también se han descrito bacteriocinas con aminoácidos modificados postraduccionalmente, que pertenecen a la clase I (lantibióticos) como lactocina S (Mortvedt *et al.*, 1991), plantaricina W (Holo *et al.*, 2001) y plantaricina C (González *et al.*, 1994), así como bacteriocinas termolábiles y con un tamaño molecular de 37 kDa pertenecientes a la clase III, como la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1990).

Los genes que codifican las bacteriocinas producidas por lactobacilos pueden estar en: (i) un plásmido, como SakP producida por *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003), sakacina G (Simon *et al.*, 2002), CurA (Tichaczek *et al.*, 1993), lactocina S (Mortvedt *et al.*, 1991), acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), acidocina B (Leer *et al.*, 1995), acidocina 8912 (Tahara *et al.*, 1992), plantaricina 423 (van Reenen *et al.*, 2003), salivaricina ABP-118 (O'Shea *et al.*, 2011), o (ii) en el cromosoma, como SakP producida por *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1994), *Lb. curvatus* L442 y *Lb. curvatus* LTH1174 (Cocolin y Rantsiou, 2007), SakX y SakT (SakT α y SakT β) producidas por *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003), SakQ (Cocolin y Rantsiou, 2007), curvaticina FS47 (Garver y Muriana, 1994), plantaricina A (Diep *et al.*, 1994), plantaricinas S y T (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993), lactacina F (LafA y LafX) (Muriana y Klaenhammer, 1987), salivaricina B (ten Brinck *et al.*, 1994), acidocina LF221 (LF221A y LF221B) (Majhenic *et al.*, 2004), gassericina A (Kawai *et al.*, 1998) y helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1990). No obstante, la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora (sección 3.3.7) como se ha descrito en el caso de SakP, cuya agrupación génica se localiza en un plásmido en *Lb.*

sakei 5 (Vaughan *et al.*, 2003) y en el cromosoma de *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1994), *Lb. curvatus* L442 y *Lb. curvatus* LTH1174 (Cocolin y Rantsiou, 2007).

Desde el punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario, las bacteriocinas producidas por lactobacilos son sustancias antimicrobianas interesantes para la industria alimentaria ya que tienen un gran potencial de aplicación en tratamientos combinados para la conservación de alimentos fermentados, refrigerados y/o pasteurizados, debido a su potente actividad frente a microorganismos alterantes y/o patógenos presentes en los alimentos (especialmente frente a *Listeria* spp.) y a algunas de sus propiedades que les confieren ventajas frente a otras bacteriocinas, como bioconservantes alimentarios. Entre estas propiedades se incluyen las siguientes: (i) estabilidad en condiciones extremas, como las que tienen lugar durante la fermentación de los productos cárnicos y lácteos; (ii) actividad antimicrobiana a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo; (iii) producción y estabilidad en leche en el rango de temperaturas 30–37°C; (iv) resistencia a la renina; (v) compatibilidad con las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores; (vi) actividad anti-*Listeria* en leche; (vii) estabilidad al calor, y (viii) estabilidad en un amplio rango de valores de pH (Messenes y de Vuyst, 2002; Drider *et al.*, 2006; Todorov, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Nissen-Meyer *et al.*, 2010; Pérez, 2012). Además, conviene destacar su papel como posibles agentes terapéuticos en distintas enfermedades, entre ellas el cáncer (Sit y Vederas, 2008; Lohans y Vederas, 2012; Shaik *et al.*, 2012).

II.4.4. PROBLEMÁTICA SANITARIA DE LOS MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Lactobacillus*

Los microorganismos del género *Lactobacillus* han sido ampliamente utilizados y consumidos a lo largo de la historia sin que su seguridad haya sido apenas cuestionada durante mucho tiempo (Franz *et al.*, 2010); sin embargo, cada vez se presta más atención a la seguridad de estos y otros microorganismos que se añaden de forma deliberada en los alimentos.

II.4.4.1. PATOGENICIDAD DE LOS LACTOBACILOS

Los casos de infección debidos a lactobacilos son raros, estimándose que representan un 0,05–0,4% de los casos de endocarditis infectiva o bacteremia (Gasser, 1994; Saxelin *et al.*, 1996; Salminen *et al.*, 1998; Borriello *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2010); sin embargo, a pesar de ello, estas infecciones tienen un alto índice de mortalidad (aprox., 25%), lo cual pone de manifiesto la necesidad de una detección precoz y un tratamiento adecuado (Cannon *et al.*, 2005). Concretamente, las especies *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. jensenii*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* y *Lb. salivarius* han sido asociadas con infecciones humanas (Sharpe *et al.*, 1973; Naude *et al.*, 1988; Saxelin *et al.*, 1996; Antony *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 1998; Mackay *et al.*, 1999; Ratio *et al.*, 1999; Wallet *et al.*, 2002; Neef *et al.*, 2003; Ze-Ze *et al.*, 2004; Makarius *et al.*, 2005; Svec *et al.*, 2007; Moudden *et al.*, 2007; Wee *et al.*, 2007; Brahimi *et al.*, 2008; Chazan *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2010). De acuerdo con una revisión realizada por Cannon *et al.* (2005), entre los años 1950 y 2003, se registraron 241 casos de infecciones

causadas por lactobacillus, que resultaron en bacteriemias y endocarditis infectiva. Las especies más frecuentemente asociadas a estos procesos fueron *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus* (35,7 y 22,9%, respectivamente, del total de los casos). No obstante, conviene destacar que en la mayoría de los casos en los que se aislaron lactobacilos de personas enfermas existían patologías subyacentes previas, o bien factores de riesgo como pueden ser válvulas cardíacas anormales, en el caso de endocarditis, y la presencia de catéteres, en el caso de septicemias (Horwitch *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Ishibashi y Yamazaki, 2001). Sin embargo, los grupos considerados de alto riesgo, donde se encuentran las personas mayores, los niños y las embarazadas, no parecen tener una mayor predisposición a las infecciones asociadas a bacterias lácticas (Adams y Marteau, 1995). Asimismo, a pesar de que en general, los pacientes inmunocomprometidos tienen más riesgo de sufrir infecciones por microorganismos patógenos y suelen estar afectados por una mayor incidencia de enfermedades oportunistas, no existen evidencias de que el consumo como probióticos de cepas del género *Lactobacillus* conlleve un incremento en el riesgo de sufrir infecciones oportunistas (Borriello *et al.*, 2003). En este sentido, estudios clínicos realizados con pacientes inmunocomprometidos (*e.g.*, pacientes con VIH), mostraron la seguridad de las preparaciones probióticas en los mismos (Wolf *et al.*, 1998; Cunningham-Rundles *et al.*, 2000; Borriello *et al.*, 2003; Wessels *et al.*, 2004).

No obstante, en los últimos tiempos han surgido algunas preocupaciones con respecto al consumo de grandes cantidades de bacterias lácticas como probióticos en alimentos, ya que se han asociado algunos casos aislados de infecciones a su uso en la alimentación humana; sin embargo, en la mayor parte de los casos no se pudo establecer una conexión directa entre el consumo de estos microorganismos en los alimentos y la infección (Adams, 1999). Rautio *et al.* (1999) describieron el aislamiento de *Lb. rhamnosus* de una infección hepática severa de una paciente diabética que admitía haber consumido diariamente, durante los meses previos a la infección, leche fermentada con *Lb. rhamnosus* GG. La cepa aislada de la paciente no pudo ser diferenciada de la cepa probiótica por ninguno de los métodos empleados en la identificación. En otro caso clínico relacionado con una bacteremia en la que se aisló una cepa de *Lactobacillus* spp., fue sugerida una relación entre mascar una cápsula probiótica y una infección dental (Mackay *et al.*, 1999), aunque el aislado no pudo ser identificado a nivel molecular (O'Brien *et al.*, 1999). En otro caso, en el que se aisló *Lb. fermentum* de una endocarditis, se relacionó su presencia con el alto consumo de leche y productos lácteos, aunque no se pudo establecer una conexión directa con la enfermedad, y ni demostrar su uso en productos lácteos en general (Gallemore *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998). Asimismo, una paciente diabética sufrió una septicemia provocada por *Lb. rhamnosus* que fue atribuida a su empleo como probiótico (Zein *et al.*, 2008). Sin embargo, diversos estudios epidemiológicos no han encontrado correlación entre el consumo de lactobacilos en la dieta y su implicación en casos de bacteriemia. En este sentido, Salminen *et al.* (2002) concluyeron que el incremento considerable en el consumo de probióticos en Finlandia no resultó en el incremento paralelo de los casos de bacteriemias asociadas a lactobacilos. De forma similar, Sullivan y Noord (2006) determinaron la incidencia de bacteriemias producidas por lactobacilos en Estocolmo (Suecia) y trataron de identificar la presencia de cepas usadas como probióticos en las personas enfermas; los resultados obtenidos demostraron que, a lo largo de un periodo de seis años, los casos de bacteriemias se mantenían

al mismo nivel, así como que estos procesos no estaban asociados a ninguna de las tres cepas probióticas incluidas en el estudio (*Lb. paracasei* F19, *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. acidophilus* NCFB1748).

A pesar de lo descrito anteriormente, la situación puede diferir en aquellos casos en los que se administra una gran cantidad de probióticos para el tratamiento de una enfermedad concreta. A este respecto, Land *et al.* (2005) detectaron casos de sepsis causados por *Lb. rhamnosus* GG cuando utilizaron este probiótico en el tratamiento de la diarrea en niños hospitalizados con una enfermedad subyacente. De forma similar, Besselink *et al.* (2008) trataron de mejorar el curso de una pancreatitis severa aguda mediante la administración una preparación comercial de probióticos (ECOLOGIC® 641, Winclove, Bio Industries Amsterdam, Países Bajos) que contenía cuatro cepas de bacterias lácticas (de las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. salivarius* y *Lc. lactis*) y dos de bifidobacterias (de las especies *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium lactis*); desafortunadamente los resultados demostraron claramente que este tratamiento no reducía el riesgo de complicaciones en la infección y que incluso estaba asociado a un aumento en la mortalidad.

II.4.4.1.1. Virulencia de *Lactobacillus*

Debido a su largo historial de seguridad y la baja incidencia de enfermedades humanas asociadas a su presencia, se considera que los lactobacilos y las bacterias lácticas no enterococales tienen un potencial de virulencia muy bajo (Franz *et al.*, 2010). No obstante, en los últimos años, se han secuenciado un gran número de genomas de bacterias lácticas (Kleerebezem *et al.*, 2003; Pridmore *et al.*, 2004; Morelli *et al.*, 2012) y se han identificado diversos determinantes génicos asociados a su posible virulencia. Así por ejemplo, en el genoma del probiótico intestinal *Lb. johnsonii* NCC 533 se ha encontrado la secuencia de una proteína que posee una homología del 50% con una proteasa de la inmunoglobulina A (IgA) de un estreptococo patógeno, puesto que esta proteína puede jugar un papel relevante en la hidrólisis de proteínas extracelulares o en la adhesión a la superficie de la mucosa, se considera que podría estar relacionada con la capacidad de esta bacteria para evadir el sistema inmunológico del hospedador (Pridmore *et al.*, 2004); sin embargo, la producción de esta proteasa de IgA por *Lb. johnsonii* NCC 533 puede considerarse asimismo una propiedad probiótica, debido a su participación en la colonización del tracto gastrointestinal (Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, Vesterlund *et al.* (2007) estudiaron la presencia de posibles factores de virulencia en cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de heces y sangre, así como de formulaciones probióticas y, a pesar de que no identificaron ningún factor de virulencia inequívoco para los lactobacilos, observaron que los aislados de sangre exhibían una mayor capacidad de adhesión a las mucosas que las cepas probióticas, aunque la diferencia no fue significativa estadísticamente. Por otra parte, Vankerckhoven *et al.* (2007) desarrollaron un modelo de endocarditis infecciosa en ratas para la evaluación del potencial patogénico de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. y de cepas probióticas. En general, los resultados revelaron que los aislados probióticos ejercían una tasa de infección más baja que los aislados clínicos en la endocarditis experimental; sin embargo, esta diferencia no se pudo correlacionar con diferencias en los procesos de adherencia o de sensibilidad a las plaquetas, por lo que los autores propusieron la existencia de otros

factores aún no caracterizados que serían los responsables de su mayor capacidad para producir esta enfermedad.

II.4.4.2. RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS DE LOS LACTOBACILOS

Como se mencionó anteriormente (sección II.4.2.2.1), para que un microorganismo pueda aplicarse en la producción de alimentos, una vez determinada inequívocamente su identidad y garantizada su pertenencia a un grupo QPS, el único requerimiento es demostrar que no contiene determinantes génicos transmisibles de resistencia a antibióticos (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2008a, 2011; Franz *et al.*, 2010; Donohue y Gueimonde, 2012; Salminen y von Wright, 2012).

II.4.4.2.1. Selección del medio y determinación de los puntos de corte para la determinación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos

En general no existen protocolos bien definidos para la determinación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos en la mayoría de las bacterias lácticas, exceptuando *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp. patógenos, ya que históricamente estos microorganismos no han sido relevantes como agentes etiológicos de enfermedades humanas (Klare *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2010). Debido a que la mayor parte de las bacterias lácticas tienen requerimientos nutricionales especiales para su crecimiento, los medios comúnmente utilizados para la determinación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos, como Mueller-Hinton o Iso-Sensitest, no son apropiados para los lactobacilos, leuconostoc y pediococos (Klare *et al.*, 2007). Asimismo, Herra *et al.* (1995) demostraron que el agar Wilkens-Chalgren, recomendado por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (NCCLS, del inglés *National Committee for Clinical Laboratory Standards*), actualmente denominado CLSI (del inglés, *Clinical Laboratory Standard Institute*), para la determinación de la resistencia a antibióticos para bacterias anaerobias no permitía el crecimiento de *Lactobacillus* spp. Sin embargo, si el mismo medio era suplementado con un 5% de sangre de caballo, los lactobacilos crecían mucho mejor (Herra *et al.*, 1995). Por lo tanto, la selección del medio de cultivo puede ejercer una gran influencia en los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad/resistencia a antibióticos para determinar el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), definida como la concentración mínima de un antibiótico, expresada en µg/ml, que inhibe el crecimiento de un microorganismo *in vitro*. Por estos motivos, la selección del medio de cultivo para este tipo de ensayos debe considerar, según Huys *et al.* (2002), los siguientes aspectos: (i) debe proporcionar los requerimientos nutricionales necesarios para alcanzar un óptimo crecimiento del microorganismo; (ii) debe proveer de una matriz apropiada que permita una difusión uniforme del antibiótico y poder reproducir los resultados, y (iii) deben existir las mínimas interacciones entre los componentes del medio y los antibióticos empleados. Además de la composición del medio, en la determinación de la resistencia a antibióticos, es importante considerar la influencia del tamaño del inóculo empleado, la temperatura y el tiempo de incubación (Ammor *et al.*, 2007).

Debido a que las bacterias lácticas son un grupo muy diverso, es difícil establecer los puntos de corte que separan las cepas resistentes de las sensibles para un determinado antibiótico. A este respecto, la mayoría de los puntos de corte están definidos a nivel de género, lo cual quiere decir que todas las

especies pertenecientes a ese género son sensibles o resistentes a un antibiótico determinado. No obstante, para algunos géneros, entre ellos el género *Lactobacillus*, esta aproximación no es suficiente, ya que las diferentes especies pueden variar considerablemente en su resistencia/sensibilidad a un determinado antibiótico, por lo que habría que determinar los puntos de corte a nivel de especie. Así, aunque la Dirección General para la Protección de la Salud y el Consumidor de la Comisión Europea (DG SANCO), mediante el Comité Científico para la Alimentación Animal (SCAN, del inglés *Scientific Committee on Animal Nutrition*), elaboró una lista con valores de puntos de corte donde incluía además del género *Enterococcus*, los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (SCAN, 2002), esta diferenciación resultó poco exhaustiva puesto que no tuvo en cuenta diferencias entre las especies pertenecientes a estos géneros. Por su parte, Danielsen y Wind (2003) evidenciaron las carencias de esta aproximación al estudiar la sensibilidad antimicrobiana de una colección de cepas de *Lactobacillus* (n=62) utilizadas como cultivos iniciadores o probióticos en alimentación, mostrando que la resistencia/sensibilidad a un antibiótico determinado para el género *Lactobacillus* es especie-dependiente. En función de sus resultados, estos autores determinaron valores de CMI para las especies de *Lactobacillus* evaluadas, sugiriendo que estos valores podrían ser empleados como puntos de corte para determinar la posible presencia de genes de resistencia a antibióticos transferibles. A este respecto, se consideraba que para una determinada especie resistente a un determinado antibiótico el valor del punto de corte dado para ese antibiótico debería ser más alto que para otras especies del mismo género sensibles a dicho antibiótico, y así, mientras SCAN (2002) considera 1 µg/ml como punto de corte para la gentamicina en lactobacilos, Danielsen y Wind (2003) sugieren un punto de corte de 128 µg/ml para *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, y un valor todavía más alto 256 µg /ml, para *Lb. acidophilus*. De forma similar, para la estreptomycin, el punto de corte recomendado por SCAN (2002) (16 µg/ml), fue considerado demasiado bajo por Danielsen y Wind (2003), quienes propusieron un valor superior (>256 µg/ml) para todos los lactobacilos. Por otra parte, mientras SCAN (2002) recomendaba un punto de corte de 4 µg/ml para la eritromicina, Danielsen y Wind (2003) encontraron este punto demasiado alto teniendo en cuenta que algunos *Lactobacillus* tienen resistencia natural a este antibiótico, y sugirieron puntos de corte de 1 µg/ml para *Lb. acidophilus*, *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*; 2 µg/ml para *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*, y 4 µg/ml para *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*. Debido a la necesidad de ajustar los puntos de corte a nivel de especie, unos años más tarde la EFSA, a través del Panel de Aditivos, Productos o Sustancias utilizados en Alimentación Animal (FEEDAP, del inglés *Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*) publicó una guía en la que adoptaba nuevos valores de punto de corte para 13 antibióticos de importancia clínica y veterinaria, introduciendo distinciones para los siguientes grupos: *Lactobacillus* homofermentativos y heterofermentativos, *Lb. plantarum*, *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lc. lactis* y *Str. thermophilus* (EFSA, 2005c). Unos años más tarde, Klare *et al.* (2007), con el objetivo de evaluar la seguridad de las cepas de bacterias lácticas usadas habitualmente en alimentación, determinaron la sensibilidad/resistencia de una gran colección de bacterias lácticas (n=473), pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, frente a 16 antibióticos, y propusieron un valor epidemiológico de punto de corte o ECOFF (del inglés, *Epidemiological Cut-Off*) para diferenciar entre resistencias intrínsecas y

adquiridas. En los últimos años, FEEDAP ha revisado y actualizado la guía publicada en 2005, y actualmente están considerados los valores de punto de corte para nueve antibióticos de importancia clínica y veterinaria (ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol) para los siguientes grupos: *Lactobacillus* homofermentativos obligados (incluyendo *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus*), grupo *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus* heterofermentativos obligados (incluyendo *Lb. fermentum*) y facultativos (incluyendo *Lb. salivarius*), *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum/pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei/paracasei*, *Bifidobacterium* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lc. lactis*, *Str. thermophilus*, *Bacillus* spp. y *Propionibacterium* (EFSA, 2012). En la actualidad, se tiene una visión más clara sobre los valores de punto de corte, que ayudan a determinar si una cepa puede considerarse resistente o sensible a un antibiótico y, gracias a los mismos, se pueden detectar cepas altamente resistentes en las que tendrá que ser investigada la presencia de genes de resistencia a antibióticos, y si esos genes son transferibles o no, conforme al sistema de evaluación de la seguridad de los microorganismos presentes en la lista QPS.

II.4.4.2.2. Resistencia a antibióticos

De forma general, para las bacterias lácticas no enterococales, se considera que las resistencias a antibióticos pueden encontrarse en cepas aisladas tanto del entorno clínico como de alimentos, y que algunas resistencias son intrínsecas y otras son transferibles. A este respecto, de los antibióticos inhibidores de la pared celular, las especies *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. reuteri* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, mientras que las cepas pertenecientes al grupo *Lb. acidophilus* son sensibles a este antibiótico (Danielsen y Wind, 2003; Delgado *et al.* 2005; Ammor *et al.*, 2007; Klare *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2010). La resistencia de estas especies del género *Lactobacillus* a la vancomicina se debe a que su peptidoglicano está compuesto por D-alanil-D-lactato en lugar de D-alanina-D-alanina (Klein *et al.*, 2000), por lo que el antibiótico no puede formar los complejos necesarios para inhibir la polimerización de este componente durante la síntesis de la pared celular (Mediavilla, 2004). Por otra parte, de los antibióticos β -lactámicos, los lactobacilos son sensibles a la mayoría de las penicilinas (piperacilina y ampicilina), excepto la oxacilina, y son resistentes a las cefalosporinas (cefotaxima y ceftriaxona) (Franz *et al.*, 2010).

Los lactobacilos son, en su mayoría, sensibles a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas como los macrólidos (eritromicina), tetraciclinas (tetraciclina), anfenicoles (cloranfenicol) y lincosamidas (clindamicina); sin embargo, son resistentes a los aminoglucósidos (neomicina, kanamicina, estreptomicina y gentamicina) (Katla *et al.*, 2001; Danielsen y Wind, 2003; Gevers *et al.*, 2003a, 2003b; Temmerman *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007b; Ammor *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2010). No obstante, se ha descrito que cepas específicas de *Lactobacillus* spp. son altamente resistentes al cloranfenicol, clindamicina, estreptomicina, eritromicina y tetraciclina (Temmerman *et al.*, 2003; Ammor *et al.*, 2007; Klare *et al.*, 2007; Flórez *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2010), lo que se atribuye, en la mayor parte de los casos, a la presencia de genes de resistencia, como, por ejemplo, el gen *cat*, que codifica la enzima cloranfenicol acetil-transferasa, descrita en *Lb. plantarum* (Ahn *et al.*, 1992) y *Lb. reuteri* (Lin *et al.*, 1996), o los genes de resistencia a la eritromicina, *erm*(B) y

erm(T), identificados en cepas de lactobacilos (Stroman *et al.*, 2003; Flórez *et al.*, 2006; Ammor *et al.*, 2007, 2008). Los genes de resistencia a la tetraciclina, como *tet*(K), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(Q), *tet*(S) y *tet*(W) (Gevers *et al.*, 2003b; Huys *et al.*, 2004; Ammor *et al.*, 2007, 2008; Flórez *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2010), y los genes de resistencia a aminoglucósidos, como *aac*(6')*Ie-aph*(2'')*Ia*, *aaa*(6')*Ie-aph*(2'')*Ia*, *aaa*(6')*-aph*(2''), *aac*(6')*-aph*(2''), *ant*(6) y *aph*(3')*-IIIa*, también han sido identificados en especies del género *Lactobacillus* (Tenorio *et al.*, 2001; Rojo-Bezares *et al.*, 2006; Ammor *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, la resistencia a macrólidos en los lactobacilos y otras bacterias lácticas puede estar asociada con una mutación (A a G) en los genes del ARN 23S (Flórez *et al.*, 2007). Además, los lactobacilos muestran resistencia, principalmente intrínseca, a la mayoría de los antibióticos inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos, como las quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacin, enoxacina o perfloxacin) o nitroimidazoles (metronidazol), sulfamidas (sulfametoxazol) y trimetoprima (Charteris *et al.*, 1998; Ammor *et al.*, 2007). En el caso del metronidazol, la mayoría de las especies del género *Lactobacillus* son resistentes porque no poseen actividad hidrogenasa, que constituye la diana de acción para este compuesto (Ammor *et al.*, 2007). Considerando las resistencias descritas, se recomienda tratar las infecciones causadas por *Lactobacillus* spp. con β -lactámicos (como la penicilina o la ampicilina) y aminoglucósidos (generalmente gentamicina) para obtener un efecto sinérgico, y con eritromicina y/o clindamicina como alternativas terapéuticas (Cannon *et al.*, 2005; Danielsen *et al.* 2007).

II.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

En los últimos años, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han recibido una atención especial, habiéndose propuesto que las de origen alimentario, y/o las correspondientes cepas bacteriocinogénicas, combinadas con otras barreras antimicrobianas, podrían contribuir a asegurar la estabilidad, seguridad y calidad higiénico-sanitaria de muchos alimentos (sección II.3.3.10.1.1). No obstante, existen diversos factores que pueden limitar su utilidad como bioconservantes alimentarios, tales como: (i) su reducido espectro de acción antimicrobiana; (ii) su bajo nivel de producción; (iii) bajo rendimiento de los protocolos de purificación empleados; (iv) la obligatoriedad de emplear exclusivamente cepas bacteriocinogénicas consideradas como microorganismos GRAS y/o QPS; (v) la escasa adaptación de algunas cepas bacteriocinogénicas a los sustratos alimentarios de interés; (vi) la pérdida espontánea de la capacidad para producir bacteriocinas; (vii) los posibles efectos adversos de las cepas empleadas en las características organolépticas de los alimentos, y/o (viii) el desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas. Por todo ello, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos (no bacteriocinogénicos de forma natural, pero bien adaptados a un alimento determinado y/o con propiedades tecnológicas relevantes) que pudieran emplearse como cultivos iniciadores y/o protectores de los alimentos constituye una alternativa atractiva que permitiría evitar algunos de estos factores limitantes.

De forma general, los sistemas de producción heteróloga se emplean para: (i) conocer la función y/o el modo de acción de ciertas proteínas y péptidos; (ii) facilitar el control transcripcional y/o traduccional

de la expresión del gen recombinante, y/o (iii) conseguir un nivel de producción mayor que el de las cepas salvajes (Makrides, 1996). En este contexto, la producción heteróloga de bacteriocinas permitiría: (i) conocer la función de las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de las bacteriocinas; (ii) incrementar la producción de bacteriocinas; (iii) producir bacteriocinas en hospedadores más seguros; (iv) construir cepas productoras de varias bacteriocinas con un amplio espectro de acción antimicrobiana que puedan impedir el desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas; (v) mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios, y (vi) conferir una actividad antimicrobiana mayor o más específica a bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores, protectores y/o probióticos (Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006; Basanta, 2007; Sánchez, 2008; Borrero, 2012).

Por todo ello, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos posee un gran interés científico y aplicado; sin embargo, el diseño de un sistema eficiente para la producción de proteínas o péptidos depende de numerosos factores, entre los que se incluyen: (i) las características del hospedador heterólogo; (ii) los elementos genéticos utilizados (*e.g.*, vector de expresión, región promotora, lugar de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción); (iii) la existencia de posibles modificaciones postraduccionales en la proteína de interés; (iv) el nivel de expresión y la localización del producto final, y/o (v) los posibles efectos tóxicos del producto final sobre el hospedador (Makrides, 1996). Generalmente, los sistemas de producción heteróloga de proteínas han utilizado *E. coli* como hospedador, ya que éste es el microorganismo mejor caracterizado genéticamente y existen numerosas herramientas genéticas disponibles para su manipulación. No obstante, su empleo para la producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas con fines alimentarios presenta limitaciones (*e.g.*, diferencias en el código genético, toxicidad, proteolisis y dificultad de secreción) e inconvenientes (microorganismo no considerado GRAS ni QPS y potencialmente patógeno), por lo que es conveniente emplear hospedadores de origen alimentario que sean seguros y además, posean un adecuado potencial tecnológico (Gutiérrez, 2005). A este respecto, las bacterias lácticas constituyen una alternativa atractiva ya que, en su mayoría se consideran microorganismos GRAS y/o QPS. Más concretamente, ciertas cepas de *Lc. lactis* se encuentran entre los hospedadores más adecuados ya que: (i) se ha secuenciado completamente su genoma; (ii) secretan un número muy reducido de proteínas; (iii) tienen escasa actividad proteolítica, y (iv) existen numerosas herramientas genéticas para su manipulación (Gutiérrez, 2005). Por otra parte, diversas especies de levaduras (*e.g.*, *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris*) también resultan interesantes como hospedadores heterólogos de bacteriocinas con fines alimentarios, ya que se les pueden aplicar las técnicas de manipulación genética de procariotas y, además, gozan de la versatilidad de los sistemas eucariotas (Gutiérrez, 2005; Basanta, 2007; Sánchez, 2008); sin embargo, algunos de los escasos estudios descritos hasta la fecha han puesto de manifiesto ciertas limitaciones para su empleo (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a).

Inicialmente, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos se basó en la clonación de los genes responsables de su síntesis, transporte y procesamiento en diferentes vectores de expresión, lo que permitió la producción de PedPA-1 en *E. coli* (Marugg *et al.*, 1992) y *Lc. lactis* (Chikindas *et al.*, 1995), LciA en *P. acidilactici* PAC1.0 (Chikindas *et al.*, 1995) y EntA en *E. faecalis* OG1X y *Lc. lactis*

IL1403 (O'Keeffe *et al.*, 1999). No obstante, el hecho de que la mayoría de las bacteriocinas se sintetizan como precursores con una extensión N-terminal de elevada homología en su secuencia aminoacídica y con un lugar de procesamiento del tipo Gly-Gly permitió hipotetizar que las señales de transporte y procesamiento de las bacteriocinas podrían ser intercambiables y funcionales para muchas de ellas (Allison *et al.*, 1995a, b). Esta hipótesis se demostró con la producción heteróloga de la lactacina F (LtaF) por *Le. gelidum* UAL187-22, empleando el sistema de procesamiento y secreción de LeuA (Allison *et al.*, 1995b); LciA, con el sistema de procesamiento y secreción de LeuA (van Belkum y Stiles, 1995) y MesY105 por *Lb. johnsonii* (Fremaux *et al.*, 1995). Por otra parte, Axelsson *et al.* (1998) desarrollaron un sistema de expresión que requería la utilización de dos plásmidos complementarios, uno con los genes necesarios para la inducción del promotor de SakA y con los que intervienen en su procesamiento y secreción, y otro que contiene los genes estructurales y de inmunidad de la bacteriocina de interés bajo el control del promotor de SakA. Por otra parte, el conocimiento de que la síntesis de NisA en *Lc. lactis* está regulada por un inductor (en este sistema, la propia NisA), que activa la transcripción de los genes involucrados en su síntesis y secreción, ha permitido el desarrollo de sistemas de expresión controlados por esta bacteriocina (sistema NICE, del inglés *Nisin Controlled Expression*). Estos sistemas han resultado de utilidad para la expresión de diversas proteínas y péptidos en diferentes bacterias lácticas (de Ruyter *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005; Morello *et al.*, 2008; Borrero, 2012), y presentan un potencial importante para la producción de diversas bacteriocinas en otros hospedadores (Bryan *et al.*, 2000).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente (secciones II.3.3.7), algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP, por lo que su transporte y procesamiento ocurre probablemente a través del sistema Sec en lugar de mediante un sistema de transporte dedicado (DTS) (Pugsley, 1993; Franke, 1998; van Wely *et al.*, 2001), como ya se ha demostrado para EntP (Gutiérrez *et al.*, 2005a, b, c; Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006). Por lo tanto, una alternativa de especial interés en la producción heteróloga de bacteriocinas consiste en el empleo de un sistema basado en la sustitución de la secuencia líder de la bacteriocina de interés por un SP de una bacteriocina u otras proteínas Sec-dependientes. A este respecto, se ha descrito la producción heteróloga de DivA, una bacteriocina Sec-dependiente de *C. divergens* (Worobo *et al.*, 1995), por cepas de *C. piscicola* y *Lc. lactis* transformadas con plásmidos que contenían únicamente el gen estructural y de inmunidad de dicha bacteriocina. Posteriormente, la transformación de *C. divergens*, *C. piscicola* y *Lc. lactis* con un vector de expresión que contenía la fusión entre el SP de DivA con la proteína madura de CbnB2 o de ColV permitió la coproducción de ambas bacteriocinas en la misma cepa (McCormick *et al.*, 1996, 1998). Por otra parte, Gutiérrez *et al.* (2005a, b, c, 2006) evaluaron la producción de la bacteriocina Sec-dependiente EntP de *E. faecium* P13 en *E. coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Pc. pastoris* y *Lc. lactis* subesp. *lactis* y *Lc. lactis* subesp. *cremoris*, y, con base en los resultados obtenidos, propusieron la utilización de estos sistemas como modelo experimental para la producción heteróloga de otras bacteriocinas y/o péptidos en hospedadores de interés en la industria alimentaria. Asimismo, se ha demostrado que la fusión de PedPA-1 de *P. acidilactici* PLBH9 y EntA de *E. faecium* PLBC21 con el SP de EntP es el único requisito necesario para la producción de estas bacteriocinas por cepas de *Lc. lactis*,

así como para la coproducción de NisA/PedPA-1 y NisA/EntA por *Lc. lactis* subesp. *lactis* DPC5598 (NisA⁺) (Martín *et al.*, 2007a, b). De manera similar, Sánchez (2008) describió la construcción de vectores de expresión que contenían el gen estructural de la bacteriocina Sec-dependiente HirJM79 (*hirJM79*), con o sin su gen de inmunidad (*hiriJM79*), bajo el control de promotores constitutivos o inducibles, que permitieron la producción heteróloga de HirJM79 biológicamente activa en los sobrenadantes de *Lc. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *Lc. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, *Lb. sakei* Lb790 y *E. faecalis* JH2-2, así como la coproducción de HirJM79 y NisA por *Lc. lactis* subesp. *lactis* DPC5598, y de HirJM79 y EntP por *E. faecium* L50/14-2. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las bacterias lácticas empleadas como hospedadores heterólogos eran capaces de producir mayores cantidades de HirJM79 que la cepa original. La variabilidad en los resultados obtenidos en estos estudios pone de manifiesto que resulta muy difícil predecir la eficacia de los modelos de producción heteróloga de bacteriocinas por las bacterias lácticas, por lo que es evidente que resulta necesario realizar un esfuerzo investigador para la mejor comprensión de todos los aspectos que determinan la misma con el objetivo de lograr el máximo rendimiento de estos sistemas.

II.5.1. SISTEMA NICE

Actualmente se dispone de un gran número de sistemas de expresión controlada de genes en bacterias lácticas (de Vos, 1999a); no obstante, de los descritos hasta la fecha, el más exitoso es el sistema NICE (Lin *et al.*, 1998; Kuipers *et al.*, 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005; Mierau *et al.*, 2005a, 2005b; Morello *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente (sección II.3.3.1), NisA es un lantibiótico producido por algunas cepas de *Lc. lactis*, que contiene aminoácidos poco usuales resultantes de modificaciones postraduccionales que dan lugar a cinco estructuras cíclicas. Su biosíntesis está codificada en un *cluster* de 11 genes (*nisABTCIPRKEFG*) distribuidos en tres operones: (i) el primer operón los conforman los genes *nisABTCIP*, que se encuentran bajo el promotor inducible P_{nisA}; (ii) el segundo operón no es inducible y engloba los genes *nisR* y *nisK*, y, finalmente, (iii) el tercer operón incluye los genes *nisF*, *nisE* y *nisG* bajo el control del promotor inducible P_{nisF} (Fig. 2.16). El primer gen del operón, *nisA*, codifica el precursor de NisA; los demás genes codifican proteínas implicadas en la modificación, translocación y procesamiento (*nisB*, *nisC*, *nisP* y *nisT*), inmunidad (*nisI*, *nisF*, *nisE* y *nisG*) y regulación de la expresión de los genes localizados bajo el control de P_{nisA} y P_{nisF} (*nisR* y *nisK*) (Kuipers *et al.*, 1998). NisR y NisK pertenecen a la familia proteínas integrantes de los sistemas de transducción de señal de dos componentes (sección II.3.3.7.4): NisK es una proteína histidín-kinasa que se encuentra en la membrana citoplasmática y NisR es un regulador de respuesta intracelular. En el proceso de autorregulación de la síntesis de NisA, NisK actúa como receptor de la molécula de NisA madura, que causa la autofosforilación de NisK y la posterior transferencia del grupo fosfato a NisR, la cual se activa (NisR*). A continuación, NisR* induce la transcripción de los promotores: P_{nisA} (*nisABTCIP*) y P_{nisF} (*nisFEG*), sin afectar al promotor que controla la expresión de *nisR* y *nisK* (Kuipers *et al.*, 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005).

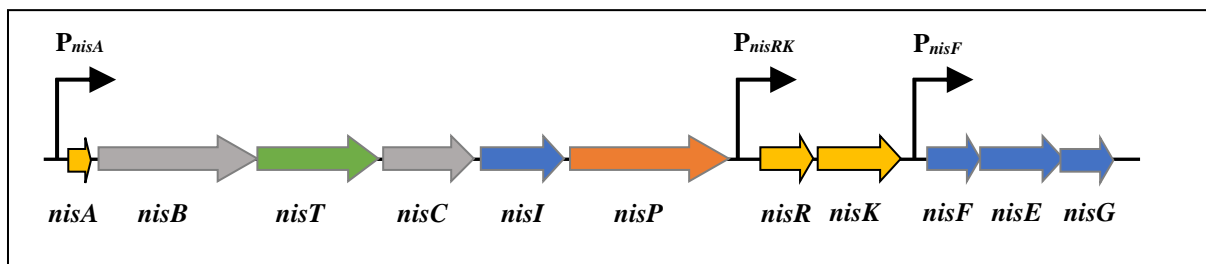


Figura 2.16. Representación esquemática del cluster génico de la nisina A (NisA). Los tres promotores que regulan la expresión de los genes del cluster de NisA se indican con flechas negras. *nisA*, gen estructural de NisA; *nisB*, *nisT*, *nisC* y *nisP*, genes involucrados en la modificación, translocación y procesamiento de NisA; *nisI*, *nisF*, *nisE* y *nisG*, genes involucrados en la inmunidad frente a NisA; y, *nisR* y *nisK*, genes involucrados en la regulación de la expresión del cluster génico de NisA. Adaptado de Zhou et al. (2006).

El peculiar sistema de autorregulación de la biosíntesis de NisA constituye la base del sistema NICE. De esta forma, cuando un gen de interés se coloca detrás del promotor inducible P_{nisA} en un plásmido (Fig. 2.17), la expresión de dicho gen puede inducirse mediante la adición de concentraciones subinhibitorias de NisA (0,1–5 ng/ml) al medio de cultivo. Dependiendo de las señales de reconocimiento de la proteína de interés, ésta se localizará en el citoplasma o, en la membrana, o bien será secretada (Fig. 2.17). La pareja hospedado-plásmido más utilizada en este sistema está formada por *Lc. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (una cepa recombinante obtenida mediante la inserción de *nisK* y *nisR* en el cromosoma de *Lc. lactis* subesp. *cremoris* MG1363) y el vector pNZ8048 que contiene un sitio de restricción *NcoI* para la fusión del gen de interés a P_{nisA} y un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (Kuipers et al., 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005).

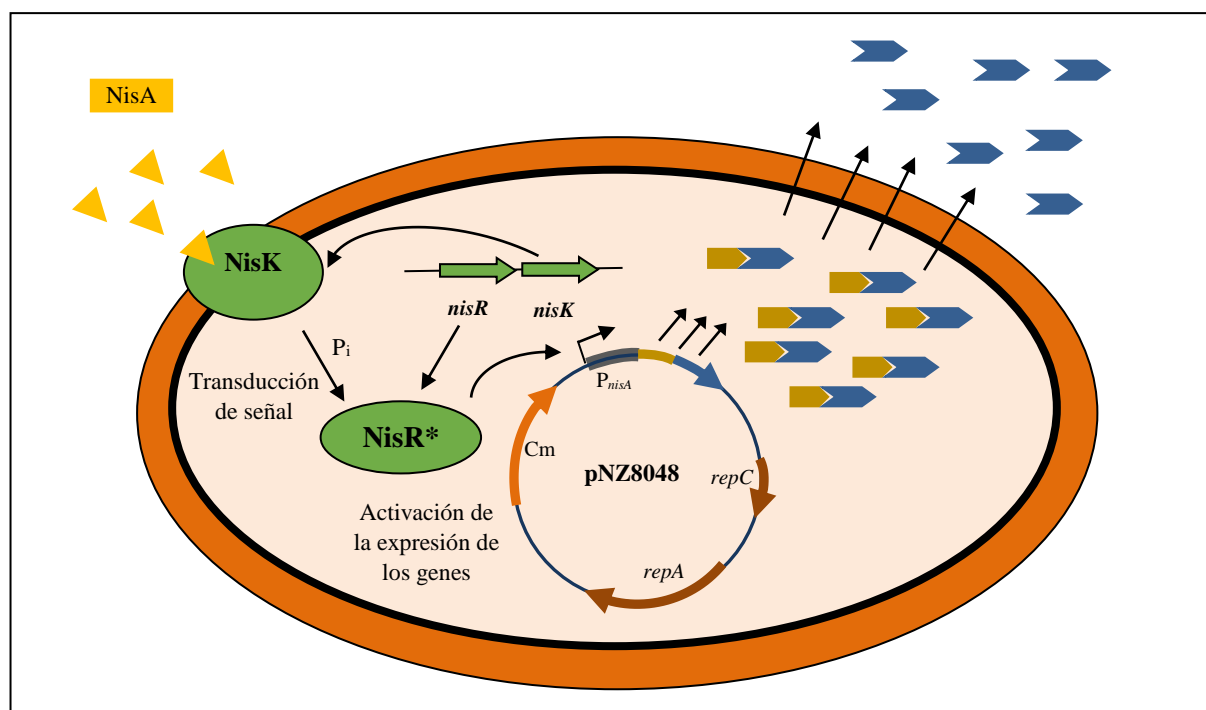


Figura 2.17. Representación esquemática del sistema NICE. NisK y NisR, proteína sensora histidín quinasa y proteína reguladora, respectivamente. El producto de expresión puede acumularse en el interior celular o ser secretado al medio extracelular dependiendo de la ausencia o presencia, respectivamente, de una secuencia señal en la construcción génica. Adaptado de Mierau et al. (2005b).

Entre las ventajas de este sistema para la producción de péptidos o proteínas en bacterias lácticas destacan: (i) su flexibilidad, puesto que la relación dosis-respuesta entre la concentración del inductor (NisA) y la producción de la proteína de interés es lineal; (ii) su inducción controlada, fácil y de bajo coste, ya que no requiere la utilización de NisA purificada y puede realizarse directamente con el sobrenadante de una cepa productora de esta bacteriocina; (iii) la elevada transcripción génica mediada por el promotor inducible, lo que permite la producción del péptido o proteína de interés en cantidades elevadas, y (iv) su utilidad en otras aplicaciones, ya que también puede utilizarse para detectar pequeñas concentraciones de NisA en sustratos alimentarios (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Lin *et al.*, 1998; de Vos, 1999b; Neu y Henrich, 2003; Mierau y Kleerebezem, 2005; Mierau *et al.*, 2005a, 2005b; Morello *et al.*, 2008; Maischberger *et al.*, 2010). Finalmente, conviene destacar la versatilidad de este sistema, puesto que puede emplearse para la expresión controlada del gen de interés en un gran número de bacterias lácticas. Así, el empleo de un sistema dual de plásmidos, uno en el que el gen de interés queda bajo el control de P_{nisA} y otro con *nisK* y *nisR*, ha permitido la utilización del sistema NICE en otras bacterias lácticas que no poseen estos genes integrados en su genoma. Por otra parte, se han desarrollado con el mismo fin vectores de expresión que incorporan conjuntamente P_{nisA} y *nisKR*, como, por ejemplo, pMSP3535 (Mierau y Kleerebezem, 2005).

II.5.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS MEDIANTE SISTEMAS DE GRADO ALIMENTARIO

La tendencia actual en la producción heteróloga de bacteriocinas con fines alimentarios es el empleo de vectores de grado alimentario en hospedadores seguros y de utilidad contrastada (Kuipers *et al.*, 1997, 1998; de Vos, 1999a; Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006; Basanta, 2007; Maischberger *et al.*, 2010; Borrero, 2012). A este respecto, de Vos (1999a) propuso que los denominados sistemas de grado alimentario deberían estar constituidos por vectores que contuvieran ADN procedente de un hospedador heterólogo considerado GRAS. En general, los sistemas de grado alimentario pueden clasificarse en: (i) sistemas que emplean marcadores de selección distintos de la resistencia a antibióticos, y (ii) sistemas de integración cromosómica (de Vos, 1999a). En lo que respecta a los sistemas basados en la utilización de marcadores de selección, éstos se clasifican en tres grupos en función del tipo de marcador utilizado: (i) sistemas basados en el empleo de azúcares (de Vos, 1999a); (ii) sistemas auxotróficos, es decir, basados en la supresión de la expresión de un determinado gen que codifica la síntesis de componentes necesarios para la supervivencia celular (Dickely *et al.*, 1995; Sørensen *et al.*, 2000; Bron *et al.*, 2002; Glenting *et al.*, 2002), y (iii) sistemas que confieren resistencia o inmunidad a sustancias consideradas como seguras (de Vos, 1999a), como, por ejemplo, LtaF (Allison y Klaenhammer, 1996) o NisA (Hughes y McKay, 1991; Takala y Saris, 2002). El principal inconveniente de los sistemas que emplean marcadores de selección consiste en que, requieren una presión selectiva constante. Sin embargo, este inconveniente podría evitarse mediante la utilización de sistemas de integración cromosómica, desarrollados para la producción de péptidos y proteínas recombinantes en *Lc. lactis* (Leenhouts *et al.*, 1998) y *Lb. casei* (Gosalbes *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000). Además de la ausencia de genes de resistencia a antibióticos

como marcadores de selección, estos sistemas presentan la ventaja de poder introducir de forma estable múltiples copias del gen de interés en el cromosoma de la cepa hospedadora (Leenhouts *et al.*, 1998). Finalmente, conviene destacar que, a pesar de que casi todas las bacterias lácticas utilizadas como hospedadores heterólogos para la producción de péptidos y proteínas recombinantes pertenecen al grupo de las denominadas “cepas de laboratorio”, que servirían de ayuda y referencia en los primeros ensayos éstas deberían sustituirse en etapas posteriores por las cepas utilizadas en la producción de alimentos en la industria (Ryan *et al.*, 1996; Buyong *et al.*, 1998; Coffey *et al.*, 1998; Hickey *et al.*, 2001; Johansen, 2003).

De lo descrito anteriormente, puede destacarse que la futura aplicación práctica de las bacteriocinas producidas por hospedadores heterólogos debería considerar la utilización de vectores de grado alimentario y hospedadores seguros (GRAS y/o QPS) y de utilidad contrastada en la industria alimentaria. No obstante, resulta de gran importancia el desarrollo, la evaluación y la optimización de cualquier sistema de producción heteróloga de bacteriocinas antes de su aplicación práctica, especialmente en lo que respecta a los niveles de producción y a la actividad biológica de las bacteriocinas secretadas heterológamente.

CAPÍTULO III

Actividad bacteriocinogénica de bacterias lácticas aisladas
de pescado, marisco y productos de la pesca

CHAPTER III

*Bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria isolated
from fish, seafood and fish products*

III.1. ABSTRACT

The present work describes the isolation, antimicrobial spectrum and preliminary characterization of bacteriocin producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from a wide variety of fish, seafood and fish products. The obtained results revealed a great variation in the LAB population frequencies, depending on the substrate and anatomic source. From the lactic microbiota, a total of 1,245 LAB isolates were randomly selected and assayed for direct antimicrobial activity by a stab-on-agar test (SOAT) against 20 Gram-positive and Gram-negative indicator strains. From those strains, a total of 197 LAB exerted direct antimicrobial activity when grown on solid media, showing a great heterogeneity in their antimicrobial spectra. Analysis of the selected 64 LAB for extracellular activity by an agar well-diffusion test (ADT) revealed that only 25 strains secreted heat-stable proteinaceous antimicrobial substances (*i.e.*, bacteriocins) in their cell-free culture supernatants. Biochemical characterization, PCR analysis and/or DNA sequencing of the superoxide dismutase gene (*sodA*) and/or 16S rRNA gene (*16S rDNA*), and/or SDS-PAGE analyses of the 64 LAB isolates with direct antimicrobial activity showed that 46 strains belong to the genus *Enterococcus*, of which 24 were identified as *Enterococcus faecium*, and 22 as *Enterococcus faecalis*. From the 18 non-enterococcal strains, seven were identified as *Pediococcus pentosaceus*, five as *Weissella cibaria*, three as *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, one as *Lb. sakei* subsp. *sakei*, one as *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, and one as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Interestingly, none of the *E. faecalis* isolates with direct antimicrobial activity was found to secrete bacteriocins under the stated experimental conditions assayed in this work. The 20 bacteriocinogenic enterococcal isolates were analyzed by PCR for detection of genes encoding previously described enterocins, which showed that 90% amplified, at least, one bacteriocin gene, with those encoding enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin P being the most prevalent (65 and 60%, respectively). Up to four target genes were simultaneously detected in a single strain, namely those encoding enterocin P, enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin Q. Moreover, preliminary *in vitro* safety evaluation of *E. faecium* isolates was carried out by detection of potential virulence factors, and analysis of hemolysin and gelatinase production, and susceptibility testing to several antibiotics of relevance for human and veterinary industry. The results reported herein demonstrate the suitability of fish, seafood and fish products as ecological niches for the isolation of LAB, including (multi)bacteriocinogenic strains, mainly enterococci, encoding previously described or, to a lesser extent, unknown broad antimicrobial spectrum bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and other food-borne pathogens of interest for the food industry.

III.2. INTRODUCTION

Lactic Acid Bacteria (LAB) are Gram-positive microorganisms, with less than 55% mol G+C content in their DNA, usually non-motile, non-sporulating rods or cocci that produce lactic acid as the main primary end product of their carbohydrate metabolism. They are widespread in nature and

commonly found in many niches including milk, plants, vegetables, meat, fish, grains, and the gastrointestinal tract of vertebrates (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). At present, LAB include the genera *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* and *Weissella* (Stiles and Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000a, 2001; Claesson *et al.*, 2007; Ogier *et al.*, 2008; Ogier and Serror, 2008; de Vos *et al.*, 2009). Many LAB have been used and consumed for thousands of years in fermented foods because of their metabolic properties, and also as a method for food preservation (de Vuyst and Leroy, 2007). Lately, it has been shown that many LAB strains are capable of inhibiting various microorganisms in the food environment as they display important antimicrobial properties with respect to food preservation and safety. Since they were recognized as being responsible for the fermentation process, LAB are deliberately added as starter cultures to different food matrices, resulting in a high degree of control over the fermentation process and standardization of the end products. Nowadays, LAB play an important role in the food industry because of their significant contribution to the organoleptic characteristics, nutritional value, and shelf-life extension of foods (de Vuyst and Leroy, 2007).

The link between fermentation and preservation is the so-called biopreservation, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety using microorganisms and/or their metabolites (Ross *et al.*, 2002). Thus, LAB may be considered as biopreservative agents as they produce a wide range of antimicrobial metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and acetaldehyde, but mainly because of the production of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins, referred to as bacteriocins, which may contribute to the preservation of a variety of foods and feeds (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Cotter *et al.*, 2005). Bacteriocins produced by LAB constitute a large and heterogeneous group of peptides or proteins that display antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive and, to a lesser extent, Gram-negative bacteria, including spoilage and food-borne pathogenic microorganisms (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Line *et al.*, 2008). LAB bacteriocins may be categorized into three main classes: (i) the lantibiotics, or post-translationally modified peptides; (ii) the non-modified, small, heat-stable peptides, and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins (Nes *et al.*, 1996; Nes and Holo, 2000; Eijssink *et al.*, 2002). Studies of a high number of class II bacteriocins have led to subgroup these compounds into five subclasses: the subclass IIa (pediocin-like anti-*Listeria* bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC); the subclass IIb (two-peptide bacteriocins); the subclass IIc (leaderless bacteriocins); the subclass IId (circular bacteriocins), and the subclass IIe (other peptide-bacteriocins) (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). Most bacteriocins characterized to date are synthesized as biologically inactive precursors (prebacteriocins) containing an N-terminal extension (the so-called double-glycine-type leader sequence or Sec-dependent signal peptide), which is cleaved off concomitantly with secretion of the active bacteriocin (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003).

Bacteriocin producers are protected from the toxicity of their own bacteriocin by the concomitant production of a cognate immunity protein (Axelsson and Holck, 1995; Venema *et al.*, 1995; Quadri *et al.*, 1995, 1997; Dayem *et al.*, 1996; Hühne *et al.*, 1996; Fimland *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006). The mode of action of immunity proteins is complex and often remains unknown, but several studies indicate that these proteins recognize and confer immunity only to their cognate bacteriocin (self-immunity) or closely related bacteriocins (cross-immunity) (Eijsink *et al.*, 1998, Fimland *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2008).

Although the spectrum of LAB bacteriocins may be broad or narrow, antimicrobial activity is generally directed against closely related species (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996). They are effective against spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, and *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial activity against Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella* has been shown, but usually in situations where the integrity of the outer membrane is compromised (Cotter *et al.*, 2005; de Vuyst and Leroy 2007). For all these reasons, during the last years, bacteriocins and bacteriocin-producing LAB-strains have been the focus of extensive research due to their potential use as natural biopreservatives for a variety of foods including fermented vegetables, meat, dairy and fish products (Daeschel and Fleming, 1984; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1999, 2002; Cleveland *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003; Ringø *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009). In this context, considering that the safety and wholesomeness of LAB of food origin has been accepted for many decades (Generally Recognized As Safe microorganisms, GRAS status, or its European equivalent concept of “Qualified Presumption of Safety”, QPS status) (EFSA 2005a, 2005b; EFSA 2007), the use of these microorganisms and/or their metabolites as biopreservatives, as a part of a hurdle preservation technology (Leistner, 2000), has been proposed to ensure the safety and hygienic quality of foods. The application of bacteriocins as part of a hurdle technology has received great attention in recent years (Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2003; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007), since the combination of bacteriocins with other treatments has proved to provide effective antimicrobial hurdles in food systems (Garriga *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Uhart *et al.*, 2004). In this respect, there are four main strategies to use bacteriocins as food biopreservatives: (i) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* as a protective and/or starter culture; (ii) use of a substrate previously fermented by a bacteriocin-producing strain as a food ingredient; (iii) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, and/or (iv) incorporation or immobilization of the bacteriocin in or onto packaging materials for development of bioactive food packaging (Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). To date, the lantibiotic nisin A is the most widely characterized bacteriocin and the only one that has been legally approved in more than 48 countries as a food additive for use in certain types of cheeses (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005).

Despite the fact that there has been an extensive investigation over the last decades on the isolation and characterization of bacteriocins and bacteriocin-producing LAB from different foods of terrestrial origin, little research has been addressed to the evaluation of the presence and applications of LAB in

fish and fish products. Although early studies suggested that LAB are not usually associated to the aquatic environments, it has been subsequently shown that some species are not uncommon in freshwater fish and their surrounding environments. With regard to this, LAB, mainly from the genera *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* and *Weissella*, are known to constitute part of the normal microbiota of aquatic animals from hatching onwards (González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Bucio *et al.*, 2006). During the last decade, the presence of LAB in several wild fresh fish species (Boulares *et al.*, 2011), aquacultured fish (Michel *et al.*, 2007; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011), seafood products as surimi (Yamazaki *et al.*, 2003), cold-smoked salmon (Tomé *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2011a), shellfish (Pinto *et al.*, 2009), marine oyster (Lee *et al.*, 2010), and the intestinal content of several marine coastal fish (Itoi *et al.*, 2008) and Atlantic cod (Seppola *et al.*, 2006) has been frequently described. Moreover, the ability of LAB isolated from fish and other aquatic animals to inhibit the growth of fish-spoilage and pathogenic bacteria has also been reported (Ringø, 2008). During the last years, some interest has been shown in the activities of these LAB associated with epithelial surfaces of the digestive tract of fish, and now it is generally accepted that LAB occur amongst the normal intestinal microbiota of fish (Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø *et al.*, 2001; Leroi, 2010). It has also been reported that some LAB isolated from the gastrointestinal tract of fish can act as probiotics (Carnevali *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Todorov *et al.*, 2011b). On the other hand, even though most LAB have been proposed by the European Food Safety Authority (EFSA) for the QPS status, which is aimed to allow strains with an established history of safety to enter to the market without extensive testing requirements (EFSA 2005a, 2005b; EFSA 2007; EFSA 2011), some genera of LAB such as *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Weissella* include fish pathogens and have been isolated from diseased fish (Hiu *et al.*, 1984; Austin and McIntosh, 1991; Baya *et al.*, 1991; Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004; Hammes and Hertel, 2006; Gatesoupe, 2008; Liu *et al.*, 2009).

For many centuries, fish has played an essential role in human nutrition and still constitutes an important part of the diet in many countries. In 2010, 86.4% of world fish production was used for direct human consumption and almost all of the remainder (13.6%) was destined for non-food products, in particular fish meal and oil. Furthermore, 56.0% of the fish destined for human consumption was commercialized in live and fresh form soon after landing or harvesting, which is often the most preferred and highly priced form. Owing to the high perishability of fish and fishery products, 90% of trade in fish and fishery products consists of processed products. A large part of this processed fish is generally used for manufacturing products for direct human consumption in frozen, cured and prepared or preserved form, and the rest for non-food uses (FAO, 2012). Immediately after fish capture, several chemical and biological changes take place, and thus fish is classified as a highly perishable food commodity. Fish shelf-life mainly depends on its initial microbiological quality and storage conditions, but the fishing method and subsequent handling practices thereafter have also a great influence (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998). Post-harvest handling, processing and transportation of fish require particular care in order to ensure proper quality and safety. Therefore, the

research and development of post-harvest systems for handling raw material are important in developing appropriate measures to: (i) increase its shelf-life; (ii) reduce physical, organoleptic, and nutritional losses, and (iii) preserve the quality and safety of the finished products. It is well established that the spoilage of fish and fish products is caused by microbial action (Gram and Huss, 1996). Therefore, preservation techniques in fish processing may rely on the control of microbial fish loads. The methods used to preserve fish are based on the control of temperature (using ice, refrigeration or freezing), water activity (drying, salting, smoking, and freeze-drying), and oxido-reduction reactions (vacuum packaging). Most often, a different combination of techniques, as a part of a hurdle technology, are applied to preserve fish (FAO, 2003-2009).

During storage of fish and fish products, the microbiota changes due to the ability of microorganisms to tolerate the preservation conditions. Under certain storage conditions, as the so-called semi-preserved seafood (*e.g.*, cold-smoked and marinated fish), the microbiota typically becomes dominated by LAB (Gram and Daalgard, 2002). Besides, lightly preserved fish products, such as smoked fish, also belong to a high-risk category with respect to the food-borne pathogen *L. monocytogenes* (FAO/WHO, 2004). In this context, it has been frequently reported that listeriosis has typically been caused by ready-to-eat (RTE) processed foods that have a long refrigerated shelf-life (Loncarevic *et al.*, 1996; Rocourt *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2000). Cases of listeriosis have been epidemiologically linked to the consumption of smoked salmon, smoked mussels, smoked rainbow trout, smoked trout, and raw oysters (Ericsson *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1998; Jørgensen and Huss, 1998; Autio *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1999; Huss *et al.*, 2000; Rørvik, 2000). Consequently, scientists, regulators and food processors have striven for the last two decades to seek out and control *L. monocytogenes* in such environments. In this context, biopreservation technology has gained special attention for its application to minimally processed seafood such as cold-smoked salmon, and has already been promoted for *L. monocytogenes* control in seafood. The development of biopreservation strategies for fish and fish products requires the identification of suitable LAB strains, preferably belonging to the LAB microbiota present in fresh fish and processing environments, since they would be already acclimatized to a seafood habitat (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009). These strains could be used as live bacterial cultures for food biopreservation, but also may find an application as probiotics for aquaculture (Pinto *et al.*, 2009). Accordingly, the present work describes the isolation, antimicrobial spectrum and preliminary characterization of bacteriocinogenic LAB from fish, seafood and fish products, in order to identify and characterize antilisterial LAB strains that could be suitable as fish biopreservatives.

III.3. MATERIALS AND METHODS

III.3.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are shown in Table III.1. Indicator microorganisms for evaluation of antimicrobial activity and bacteriocin screening include spoilage and food-borne

Table III.1. Bacteriocinogenic LAB, indicator microorganisms and positive control strains used in this study.

Microorganisms	Strains	Relevant characteristics ^a	Source or reference ^b
Bacteriocinogenic strains		Bacteriocin(s) produced	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	347	Pediocin PA-1 (PedPA-1)	Moreira (1993), Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>Lactococcus lactis</i>	BB24	Nisin A (NisA)	Cintas (1995), Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lb706	Sakacin A (SakA)	Schillinger and Lücke (1989)
<i>Enterococcus faecium</i>	L50	Enterocin L50 (L50A and L50B) (EntL50), Enterocin P (EntP) and Enterocin Q (EntQ)	Cintas (1995), Cintas <i>et al.</i> (1998a, 2000b)
<i>E. faecium</i>	P13	EntP	Cintas <i>et al.</i> (1997)
<i>E. faecium</i>	T136	Enterocin A (EntA) and Enterocin B (EntB)	Casaus <i>et al.</i> (1997)
Indicator strains		Strain serotype, metabolite production or serovar	
<i>Lactococcus piscium</i>	4493 ^T	Nd	CECT
<i>Lactococcus garvieae</i>	4531 ^T	Nd	CECT
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	570 ^T	Nd	CECT
<i>Lb. sakei</i>	2714	Nd	NCFB
<i>Carnobacterium divergens</i>	4016 ^T	Nd	CECT
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (formerly <i>C. piscicola</i>)	4020	Nd	CECT
<i>Listeria monocytogenes</i>	911	1/2c	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	932	1a	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	935	4b	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	936	1/2b	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	4031 ^T	1a	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	4032	4b	CECT
<i>Listeria ivanovii</i>	913 ^T	5	CECT
<i>Listeria grayi</i>	931 ^T	Nd	CECT
<i>Clostridium botulinum</i>	551	Type A toxin	CECT
<i>Cl. botulinum</i>	581	Type A toxin	CECT
<i>Cl. botulinum</i>	4610	Type B toxin	CECT
<i>Cl. botulinum</i>	4611	Type E toxin	CECT
<i>Cl. botulinum</i>	4612	Type F toxin	CECT
<i>Clostridium perfringens</i>	376 ^T	Type A toxin, haemolysins, lethal toxins	CECT
<i>Staphylococcus aureus</i>	976	Enterotoxin A, β-haemolysin	CECT
<i>St. aureus</i>	4459	Enterotoxin B	CECT
<i>St. aureus</i>	4466	Enterotoxin D	CECT
<i>Salmonella enterica</i>	443	typhimurium	CECT
<i>S. enterica</i>	554	paratyphi	CECT
<i>S. enterica</i>	4396	enteritidis	CECT
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	847 ^T	Nd	CECT
<i>Shewanella algae</i>	5071 ^T	Nd	CECT
<i>Shewanella baltica</i>	323 ^T	Nd	CECT
<i>Shewanella hanedai</i>	5194 ^T	Nd	CECT
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	378 ^T	Nd	CECT
Positive control strains		Bacteriocin or virulence factor genotype and/or phenotype	
<i>Enterococcus hirae</i>	DCH5	hirJM79 ⁺ (Hiracin JM79)	Sánchez <i>et al.</i> (2007b), Sánchez (2008)
<i>Enterococcus faecalis</i>	INIA4	entAS-48 ⁺ (Enterocin AS-48)	Núñez <i>et al.</i> (1997)
<i>E. faecalis</i>	1071	ent1071A ⁺ and ent1071B ⁺ (Enterocin 1071A and enterocin 1071B)	Franz <i>et al.</i> (2002)
<i>E. faecalis</i>	DBC5	ef1097 ⁺ (Enterococcin V583)	Sánchez <i>et al.</i> (2007b), Sánchez (2008)
<i>E. faecalis</i>	DBH9	entL ⁺ (Enterolysin A)	Sánchez <i>et al.</i> (2007a)
<i>E. faecalis</i>	pAD1	Hly ⁺	Gilmore <i>et al.</i> (1994)
<i>E. faecalis</i>	F2	efaAfs ⁺ , agg ⁺ , cylMBA ⁺ , cpd ⁺ , cob ⁺ , ccf ⁺ , Prt ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	F10	efaAfm ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	P4	efaAfs ⁺ , gelE ⁺ , agg ⁺ , cylMBA ⁺ , cpd ⁺ , cob ⁺ , ccf ⁺ , Gel ⁺ , Prt ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	P36	efaAfs ⁺ , gelE ⁺ , agg ⁺ , cylMBA ⁺ , esp ⁺ , cpd ⁺ , cob ⁺ , ccf ⁺ , Gel ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	OG1s	gelE ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>E. faecalis</i>	EBH1	efaAfs ⁺	Eaton and Gasson (2001)

^aNd, not determined; Gel, Hly, and Prt: gelatinase, hemolysin, and protease phenotypes, respectively. ^bAbbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); NCFB, National Collection of Food Bacteria (Shinfield, Reading, Berkshire, UK).

pathogenic bacteria of concern for the fish industry, as well as microorganisms of health significance. LAB cultures were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 30°C. *Listeria* spp. strains were grown aerobically in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid) at 30°C. *Clostridium* strains were grown anaerobically (Oxoid anaerobic system) in reinforced clostridial medium (Oxoid) at 37°C. *Salmonella* spp. and *Staphylococcus* spp. strains were grown aerobically in tryptone soya broth (TSB, Oxoid) at 37°C. All other bacteria used as indicator microorganisms were grown aerobically in BHI broth (Oxoid) at 30°C.

III.3.2. Isolation and direct antimicrobial activity of LAB from fish, seafood and fish products

The samples used in this study for bacterial isolation (Table III.2) were all intended for human consumption and procured from Spanish retail fish markets and supermarkets, packaged in iceboxes, and aseptically handled and transported to the laboratory. From each fish specimen, skin portions were taken from two to three locations on the surface (1 cm²), as well as aliquots (10 g) of muscle and gut. When stated, 10 g of the entire specimen were used. Samples were placed in sterile Stomacher bags and aseptically homogenized in 90 ml of sterile peptone water (1%, wt/vol) containing NaCl (0.8%, wt/vol, except for the dry-salted cod sample, where 6.5%, wt/vol, was used). Then, samples were serially 10-fold diluted and plated (2 to 10 plates per dilution) onto plate count agar (PCA, Oxoid), MRS (Oxoid) agar (1.5%, wt/vol), and kanamycin aesculin azide (KAA, Oxoid) agar (1.5%, wt/vol) plates for total aerobic, LAB, and enterococci counts, respectively. After plate incubation at 25°C under microaerophilic conditions for 2–5 days, microbial counts were determined. Subsequently, a total of 1,245 LAB colonies were randomly selected from the MRS and KAA agar plates, and assayed for antimicrobial activity by a stab-on-agar test (SOAT) as previously described (Cintas *et al.*, 1995) using 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria as indicator microorganisms (Table III.1). Briefly, the selected strains were stabbed onto MRS plates and incubated at 32°C for 5 h, and then 40 ml of the corresponding soft agar (0.8%, wt/vol) media containing about 1×10⁵ cfu/ml of the indicator strain was poured onto the plates. After incubation at 32°C for 16–24 h, the plates were checked for inhibition zones (absence of visible microbial growth around the spotted cultures), and only inhibition halos with diameters higher than 3 mm were considered as positive results. The 197 strains showing antimicrobial activity against, at least, one of the tested indicator microorganisms, were stored in the appropriate media containing 15% (vol/vol) glycerol (Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, MO, USA) at –20 and –80°C.

III. 3.3. Screening for bacteriocin-producing LAB isolates

Sixty-four out of 197 LAB isolates showing antimicrobial activity were selected on the basis of their inhibition spectrum against the tested Gram-positive and Gram-negative bacteria, and assayed for bacteriocin activity. Selected isolates were grown in MRS broth at 30°C until the stationary phase (OD₆₀₀ nm of *ca.* 1.0), and their cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation at 12,000 × g at 4°C for 10 min. Subsequently, supernatants were adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filter-

Table III.2. Fish, seafood and fish products, and anatomic source used in this study.

Sample	Scientific name	Anatomic source
Molluscs		
Squid	<i>Loligo vulgaris</i>	Viscera
Common octopus	<i>Octopus vulgaris</i>	Muscle
Common cockle	<i>Cerastoderma edule</i>	Whole specimen
Mussel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Whole specimen
Crustaceans		
Swimcrab	<i>Necora puber</i>	Viscera
Norway lobster	<i>Nephrops norvegicus</i>	Muscle
		Viscera
Marine fish		
Ling	<i>Molva molva</i>	Liver
		Viscera
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	Skin
		Muscle
		Viscera
Albacore	<i>Thunnus alalunga</i>	Skin
		Muscle
Megrim	<i>Lepidorhombus boscii</i>	Skin
		Muscle
		Roe
Seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Skin
		Muscle
		Viscera
Freshwater fish		
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Skin
		Muscle
		Viscera
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	Muscle
Ready-to-eat fish products		
Cold-smoked Atlantic salmon	<i>S. salar</i>	Muscle
Marinated Atlantic salmon	<i>S. salar</i>	Muscle
Dry-salted cod	<i>Gadus morhua</i>	Muscle

sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), and stored at –20°C until further use. Antimicrobial activity of supernatants against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table III.1) was determined by an agar well-diffusion test (ADT) as previously described (Cintas *et al.*, 1995). Briefly, appropriate soft agar media (60 ml) were inoculated with approximately 1×10^5 cfu/ml of the indicator strain and poured onto a Petri dish. After cooling, wells (6-mm diameter) were made in the agar, and 50 µl of supernatants was added. The plates were kept at 4°C for 2 h, and then incubated at 32°C for 16–24 h. After incubation, the extracellular antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells.

In order to investigate the nature of the antimicrobial compounds, aliquots of supernatants from the 25 strains showing extracellular antimicrobial activity were treated with proteinase K (Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, MO, USA) at a final concentration of 5 and 10 mg/ml at 37°C for 3 h, and then heated at 100°C for 10 min. Supernatants treated in the same way but without proteinase K were set up as positive controls. To determine the heat stability of the antimicrobial compounds, aliquots of

the 25 supernatants were heated to 65°C for 30 min, 75°C for 15 min, 100°C for 10 min, and 121°C for 15 min. Untreated supernatants were used as positive controls. In all these experiments, residual antimicrobial activity after heat treatments was determined by an ADT as described above.

The antimicrobial activity of the supernatants of the 25 bacteriocin producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) strains against the food-borne pathogenic bacteria *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *St. aureus*, and *Salmonella* spp., as well as their self- and cross-immunity against themselves and previously characterized bacteriocin producers, was determined by an ADT.

III.3.4. Taxonomic identification of LAB isolates

The 64 selected LAB with direct antimicrobial activity were subjected to classical biochemical tests, including Gram-reaction (Gregersen, 1978), morphology determination (phase-contrast microscopy), catalase activity, growth in aerobic/anaerobic conditions, and determination of final pH of the cultures. Additionally, complementary biochemical tests for the genus *Enterococcus* were carried out by growth in KAA agar (1.5%, wt/vol) at 37°C, Slanetz and Barley (SB, Oxoid) agar (1.5%, wt/vol) at 45°C, and ethyl violet azide (EVA) broth (Pronadisa, Madrid, Spain) at 37°C.

The assignment of LAB isolates to the genus *Enterococcus*, as well as identification of the strains as *E. faecium* or *E. faecalis*, was performed by using genus- and species-specific PCR primers, respectively. Oligonucleotide primers used in this study (Table III.3) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). Total bacterial DNA from the 64 LAB was purified with the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madrid, Spain), and used as target DNA for PCR amplifications in 50 µl reaction mixtures containing 1-3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, 0.2mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 1 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). Reactions without template DNA were set up as negative controls. PCR mixtures were subjected to thermal cycling under the following conditions: initial denaturation (97°C for 2 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 sec), annealing (at an appropriate temperature for 30 sec), and elongation (72°C for 20 sec), and a final 7-min extension at 72°C, in a DNA thermal cycler (Techne, Cambridge, UK). The amplified PCR products were resolved by electrophoresis through 2% (wt/vol) agarose (Pronadisa) gels, and analyzed with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain).

In order to confirm or determine the taxonomic identification of dubious enterococcal species, PCR amplification and DNA sequencing of two different genes were carried out, namely the 16S rRNA gene and the superoxide dismutase gene (*sodA*), according to the methods described by Kullen *et al.* (2000) and Poyart *et al.* (2000), respectively.

The non-enterococcal strains were taxonomically identified by PCR-amplification and DNA sequencing of the 16S rRNA gene and/or *sodA*, and, when required, by comparing their whole-cell protein profiles determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) with those of previously described bacterial strains at the University of Ghent (BCCM/LMG Culture Collection, Ghent, Belgium).

Table III.3. Primers used in this study.

Primer pairs	Sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)	Target gene	Reference(s)
Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCAACCAACGCGAAC	112	<i>tuf</i>	Ke <i>et al.</i> (1999)
F1 F2	GCAAGGCTTCTTAGAGA CATCGTGTAAAGCTAACTTC	550	<i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
E1 E2	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941	<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
d1 d2	CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	480	<i>sodA</i>	Poyart <i>et al.</i> (2000)
plb16s mlb16s	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGCTGCTGGCACGTAGTTAG	500	16S rDNA	Kullen <i>et al.</i> (2000)
TH10 LA1	GATTATGAAACATTTAAAAATTTTGTC AAAACCACCTATAGACATTCCTGC	172	<i>entA</i>	Aymerich <i>et al.</i> (1996)
EntB3 EntB5	AGACCTAACAACTTATCTAAAG GTTGCATTTAGAGTATACATTGTC	126	<i>entB</i>	Casaus <i>et al.</i> (1997)
EntP1 EntP2	ATGAGAAAAAATTTATTTAGTTTACTCTTATTGG TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG	216	<i>entP</i>	Cintas <i>et al.</i> (1997)
EntL50-R1 EntL50-R2	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGC TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCAATTTGATC	286	<i>entL50A</i> - <i>entL50B</i>	Cintas <i>et al.</i> (1998a), Citti (2005)
EntQ-R1 EntQ-R2	ATGAATTTTCTTAAAAATGGTATCGCAAAATG TTAAACAAGAAATTTTTCCTATGGCAAG	105	<i>entqA</i>	Cintas <i>et al.</i> (2000b), Citti (2005)
AS48-R1 AS48-R2	TCGGTATACCAGCAGCAGTT TGCTGCAGCGAGTAAAGAAA	125	<i>entAS-48</i>	Gálvez <i>et al.</i> (1986), Citti (2005)
Ent1071AB-R1 Ent1071AB-R2	GGGGGAGAGTCGGTTTTTAG ATCATATGCGGGTTGTAGCC	273	<i>ent1071A</i> - <i>ent1071B</i>	Balla <i>et al.</i> (2000)
PCEL-F PCEL-R	CGATTCTGTGTAGGAACC GTACATCTCCATATACTTTTCC	1,770	<i>entL</i>	Nilsen <i>et al.</i> (2003), Hickey <i>et al.</i> (2003)
CylLLS-R1 CylLLS-R2	GTGTTGAGGAAATGGAAGCG TCTCAGCCTGAACATCTCCAC	324	<i>cylL</i> <i>LS</i>	Gilmore <i>et al.</i> (1994), Citti (2005)
EF1097-F3 EF1097-R3	GGCGATGGCATTACTAATGACATTAGG CTTAGCCACATTGAACTGCCATAAAGC	408	<i>ef1097</i>	Swe <i>et al.</i> (2007)
HNZ-F HPJE-R	AAACTCATCATGAAAAAGAAAGTATTAACATTGTGTTATTCTAGG ATAAGTTAAGCTTGTAACCTTCTAGGTGCCATGGACC	250	<i>hirJM79</i>	Sánchez <i>et al.</i> (2008), Sánchez (2008)
TE3 TE4	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1,553	<i>agg</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE9 TE10	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	<i>gelE</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE13 TE14	CTGATGGAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATT	742	<i>cylM</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE15 TE16	ATTCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTCTTTTCCAAC	843	<i>cylB</i>	Eaton and Gasson (2001)
CylA+ CylA-	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	701	<i>cylA</i>	Coque <i>et al.</i> (1995)
TE34 TE36	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCAATGCGGAA	933	<i>esp</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE5 TE6	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	705	<i>efaAfs</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE37 TE38	AACAGATCCGCATGAATA CATTTTCATCATCTGATAGTA	735	<i>efaAfm</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE51 TE52	TGGTGGGTTATTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782	<i>cpd</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE49 TE50	AACATTCAGCAACAAAGC TTGTCAATAAAGGTGGTCAT	1,405	<i>cob</i>	Eaton and Gasson (2001)
TE53 TE54	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543	<i>ccf</i>	Eaton and Gasson (2001)

III.3.5. PCR detection of enterocin structural genes and potential virulence factors

PCR amplification of known bacteriocin structural genes was performed with specific primers for enterocin A (*entA*), enterocin B (*entB*), enterocin P (*entP*), enterocin L50 (*entL50A-entL50B*), enterocin Q (*entqA*), enterocin AS-48 (*entAS-48*), enterocin 1071A and 1071B (*ent1071A-ent1071B*), enterolysin A (*entL*), the cytolysin (hemolysin-bacteriocin) precursor (*cylL_L-cylL_S*), enterococcin V583 (*ef1097*), and hiracin JM79 (*hirJM79*) (Table III.3) using total bacterial DNA from the 20 bacteriocinogenic *Enterococcus* spp. isolates. Some of the indicator strains listed in Table III.1 were used as positive controls for amplification of *entA*, *entB*, *entP*, *entL50A-entL50B*, and *entqA*. *E. faecalis* INIA4, *E. faecalis* F2, *E. faecalis* DBC5, *E. faecalis* DBH9, *E. faecalis* 1071, and *E. hirae* DCH5 were used as positive controls for amplification of *entAS-48*, *cylL_L-cylL_S*, *ef1097*, *entL*, *ent1071A-ent1071B*, and *hirJM79*, respectively.

PCR detection of genes encoding potential virulence factors in the enterococcal strains was also performed using the following primer pairs: TE3/TE4 for detection of *agg* (encoding the aggregation substance); TE9/TE10 for *gelE* (gelatinase); TE13/TE14 for *cylM* (posttranslational modification of cytolysin); TE15/TE16 for *cylB* (transport of cytolysin); CylA+/CylA- for *cylA* (activation of cytolysin); TE34/TE36 for *esp* (enterococcal surface protein); TE5/TE6 for *efaAfs* (cell wall adhesins of *Enterococcus faecalis*); TE37/TE38 for *efaAfm* (cell wall adhesins of *E. faecium*); TE51/TE52 for *cpd* (sex pheromones); TE49/TE50 for *cob* (sex pheromones), and TE53/TE54 for *ccf* (sex pheromones) (Gilmore *et al.*, 1994; Coque *et al.*, 1995; Eaton and Gasson, 2001). *E. faecalis* P4 was used as a positive control for amplification of *agg*, *E. faecalis* OG1s for *gelE*, *E. faecalis* P36 for *esp*, *E. faecalis* EBH1 for *efaAfs*, *E. faecium* F10 for *efaAfm*, and *E. faecalis* F2 for *cpd*, *cob*, and *ccf* (Table III.1).

III.3.6. Gelatinase, hemolysin and protease production, and antibiotic susceptibility testing

For determination of gelatinase production, single colonies of *Enterococcus* spp. strains previously grown on MRS agar (1.5%, wt/vol) were streaked onto Todd-Hewitt agar (1.5%, wt/vol) (Oxoid) containing 30 g of gelatin (Oxoid) per litre, grown overnight at 37°C, and placed at 4°C for 5 h before examination for zones of turbidity around the colonies indicating proteolysis. *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 were used as positive and negative controls, respectively.

In order to investigate hemolysin production, enterococcal strains were grown overnight in MRS broth at 37°C, and subsequently streaked onto layered fresh horse blood (5%, vol/vol) (Oxoid) on Columbia agar base (1.5%, wt/vol) (Oxoid). The plates were incubated at 37°C for 24–48 h. The hemolytic reaction was recorded by the observation of a clear zone of lysis around the colonies (β -hemolysis), a partial lysis and greening zone (α -hemolysis) or no reaction (γ -hemolysis). *E. faecalis* pAD1 and *P. acidilactici* 347 were used as positive and negative controls for β -hemolysis, respectively.

Determination of protease activity was carried out by streaking the strains, previously grown overnight in MRS broth at 32°C, onto TSA (Oxoid) containing 1.5% (wt/vol) of skim milk (Oxoid). After incubation at 37°C for 24 h, the presence of a clear halo around the colonies was considered as a positive reaction. *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* F2 were used as positive and negative controls, respectively.

Antimicrobial susceptibility patterns of *E. faecium* strains were determined by the disk diffusion method (Bauer *et al.*, 1966). Antibiotic-containing disks (Oxoid) were overlaid on Diagnostic Sensitivity Test (Oxoid) agar previously seeded with approximately 1×10^5 cfu/ml of each enterococcal isolate. The antibiotics tested were ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), fusidic acid (10 µg), gentamycin (10 and 120 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin G (10 IU), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg). Inhibition zone diameters were measured after overnight plate incubation at 37°C. Resistance phenotypes were recorded following the guidelines established by the Clinical Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) (CLSI, 2003, 2011).

III.4. RESULTS

III.4.1. Composition of bacterial microbiota from fish, seafood and fish products, and incidence of LAB with direct antimicrobial activity

Total bacterial populations from squid, rainbow trout, cockle, mussel, ling, seabass, octopus, sardine, cold-smoked, marinated and fresh Atlantic salmon, albacore, swimcrab, Norway lobster, dry-salted cod, and megrim determined from PCA countings revealed a great variation on the microbial loads depending on the aquatic species and anatomic source (Table III.4). Total bacterial populations of samples obtained at the supermarkets ranged from 8.5×10^4 cfu/g for octopus to 3.2×10^7 cfu/g for marinated Atlantic salmon. However, bacterial populations in samples collected from the retail fish markets ranged from 4.0×10^2 cfu/cm² for rainbow trout to 9.6×10^6 cfu/cm² for megrim. Amongst the RTE products, cold-smoked salmon showed the lowest microbial load (2.4×10^3 cfu/g), while marinated Atlantic salmon presented the highest bacterial population (3.2×10^7 cfu/g), which was also the highest count of all the samples tested in this study. Specimens from aquaculture differed in their microbial loads. In this respect, rainbow trout and seabass showed low bacterial counts (approx., 1.0×10^2 and 1.0×10^3 cfu/g or cm², respectively) compared to those of fresh Atlantic salmon (approx., 1.0×10^6 cfu/g). The counts obtained for viscera, skin, and muscle ranged from 8.0×10^2 cfu/g (rainbow trout) to 1.2×10^6 cfu/g (sardine), from 4.2×10^2 cfu/cm² (rainbow trout) to 9.6×10^6 cfu/cm² (megrim) and from 3.8×10^3 cfu/g (seabass) to 6.3×10^6 cfu/g (fresh Atlantic salmon), respectively. It should be noted that rainbow trout bore the lowest total bacterial population.

Table III.4. Microbial loads from fish, seafood and fish products, and percentages of LAB and enterococcal populations.

Sample/ Anatomic source	Origin ^a	Bacterial populations (cfu/g or cfu/cm ²) ^b			Percentages (%) of LAB and enterococcal populations		
		Total population	LAB population	Enterococcal population	LAB pop./ Total pop.	Enterococcal pop./Total pop.	Enterococcal pop./LAB pop.
Squid	RFM/TF						
Viscera		1.8×10 ⁵	1.2×10 ³	6.5×10 ²	0.7	0.4	54.6
Octopus	S/TF						
Muscle		8.5×10 ⁴	6.4×10 ⁴	2.1×10 ⁴	75.1	24.6	32.8
Cockle	RFM/TF						
Whole specimen		8.0×10 ³	1.8×10 ³	9.3×10 ²	22.5	11.7	51.9
Mussel	RFM/A						
Whole specimen		1.1×10 ³	7.7×10 ²	3.3×10 ²	69.7	29.5	42.4
Swimcrab	RFM/TF						
Viscera		7.9×10 ³	1.0×10 ²	2.6×10 ¹	1.3	0.3	25.0
Norway lobster	RFM/TF						
Viscera		7.9×10 ⁴	4.1×10 ²	3.6×10 ²	0.5	0.5	89.4
Muscle		1.0×10 ⁴	3.0×10 ²	8.3×10 ¹	2.9	0.8	27.5
Ling	RFM/TF						
Liver		4.0×10 ⁴	1.0×10 ²	1.0×10 ²	0.3	0.3	100
Viscera		3.0×10 ³	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sardine	RFM/TF						
Skin		2.8×10 ⁵	1.2×10 ³	3.2×10 ¹	0.4	1.1×10 ⁻⁴	2.6
Muscle		1.5×10 ⁵	6.0×10 ²	3.8×10 ¹	0.4	2.6×10 ⁻⁴	6.3
Viscera		1.2×10 ⁶	3.0×10 ⁴	5.5×10 ²	2.5	4.6×10 ⁻⁴	1.8
Albacore	S/TF						
Skin		2.9×10 ⁵	2.5×10 ⁴	2.7×10 ²	8.4	0.1	1.1
Muscle		2.7×10 ⁵	2.2×10 ⁴	3.2×10 ¹	7.9	0.01	0.1
Megrim	RFM/TF						
Skin		9.6×10 ⁶	1.7×10 ⁵	7.0×10 ²	1.8	7.3×10 ⁻⁵	0.4
Muscle		3.6×10 ⁶	3.6×10 ⁴	1.3×10 ²	1.0	3.4×10 ⁻⁵	0.4
Roe		4.3×10 ⁶	1.0×10 ⁵	6.9×10 ¹	2.3	1.6×10 ⁻⁵	0.1
Seabass	RFM/A						
Skin		3.5×10 ³	7.1×10 ²	1.5×10 ¹	20.4	0.4	2.1
Muscle		3.8×10 ³	2.2×10 ²	1.0×10 ¹	5.7	0.3	4.6
Viscera		4.5×10 ³	3.9×10 ²	0.0	8.7	0.0	0.0
Rainbow trout	RFM/A						
Skin		4.0×10 ²	3.0×10 ²	1.0×10 ²	75.0	25.0	33.3
Muscle		Nd ^c	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Viscera		8.0×10 ²	5.0×10 ²	0.0	62.5	0.0	0.0
Atlantic salmon							
Fresh Muscle	S/A	6.3×10 ⁶	4.5×10 ⁵	2.5×10 ³	7.2	0.04	0.6
Cold-smoked	S (RTE)/A	2.4×10 ³	2.1×10 ³	Nd	89.1	Nd	Nd
Marinated	S (RTE)/A	3.2×10 ⁷	2.6×10 ⁷	Nd	80.7	Nd	Nd
Dry-salted cod	S (RTE)/TF						
Muscle		1.6×10 ⁵	1.0×10 ⁴	Nd	6.3	Nd	Nd

^aAbbreviations: RFM, retail fish market; S, supermarket; TF, traditional fishing; A, aquaculture; RTE, ready-to-eat product. ^bTotal, LAB, and enterococcal populations (pop.) determined by counting on PCA, MRS and KAA agar, respectively. ^cNd, not determined.

LAB counts on MRS agar ranged from absence for ling to 2.6×10^7 cfu/g for marinated Atlantic salmon (Table III.4). Besides, there were no significant differences in the microbial loads between samples of fresh fish from aquaculture and traditional fishing. The RTE samples showed microbial loads of 2.1×10^3 cfu/g for cold-smoked Atlantic salmon, 1.0×10^4 cfu/g for dry-salted cod, and 2.6×10^7 cfu/g for marinated Atlantic salmon. Frequencies of LAB amongst the total bacterial population represented 62.5–89.1% in mussel, rainbow trout, octopus, and cold-smoked and marinated Atlantic salmon; 22.5% in cockle; 6.3–11.0% in dry-salted cod, ling, seabass, albacore and fresh Atlantic salmon; and only 0.5–2.5% in squid, swimcrab, Norway lobster, sardine and megrim.

Enterococcal populations isolated on KAA agar ranged from absence in viscera of rainbow trout, ling, and seabass to 2.1×10^4 cfu/g in octopus muscle (Table III.4). Amongst the total population, enterococci represented less than 1% for all samples except cockle, rainbow trout skin, octopus muscle, and mussel, in which represented 11.7, 25.0, 25.8, and 32.5%, respectively. On the other hand, enterococcal populations amongst LAB population represented less than 1% for fresh Atlantic salmon muscle, albacore muscle and megrim; 1–6.3% for albacore skin, seabass and sardine; and 25–90% for swimcrab viscera, octopus muscle, rainbow trout skin, mussel, cockle, squid viscera and Norway lobster. It should be noted that all the LAB isolates from ling liver were identified as enterococci.

A total of 1,245 LAB strains, including representatives of all the morphologies and aquatic origins, were selected from the MRS and KAA agar plates, and screened for direct antimicrobial activity against 20 indicator microorganisms by a SOAT (Table III.5, Supplemental Data, and Fig. 3.1, panel A). A total of 197 strains, which represent a 15.8%, showed direct antimicrobial activity against, at least, one of the tested indicator microorganisms, and 158 isolates (12.7%) exerted antimicrobial activity against, at least, one of the *L. monocytogenes* indicator strains (Table III.6). It is worth mentioning that from these 197 strains, 70.5% showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* CECT935, 70.1% against *L. monocytogenes* CECT4032, and 46.7% against *L. monocytogenes* CECT936. Besides, 87.8% exhibited direct antimicrobial activity against *Lactococcus* spp., 76.7% against *E. faecium*, 75.6% against *Lactobacillus* spp., 68.5% against *Br. thermosphacta*, 67.7% against *Carnobacterium* spp., and 53.3% against *P. acidilactici*. Moreover, 77.7% of the LAB isolates inhibited the Gram-negative indicators *Shewanella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* CECT378.

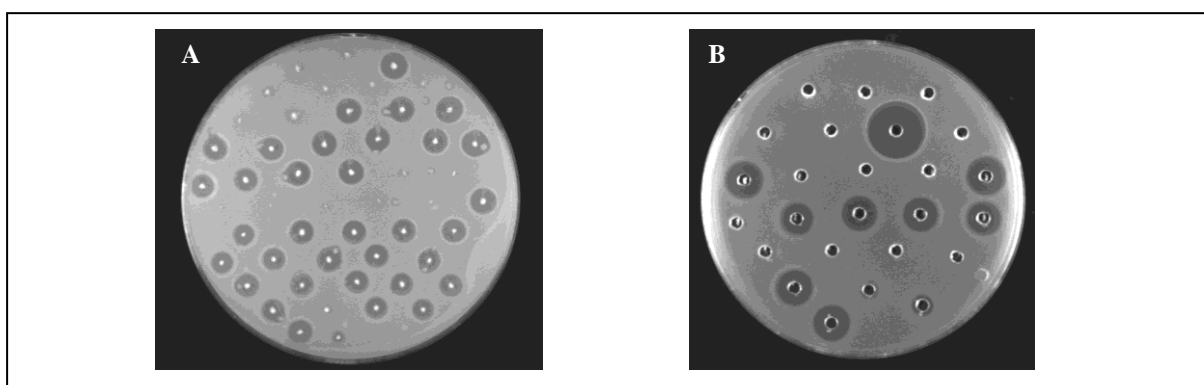


Figure 3.1. Direct antimicrobial activity of selected LAB isolates against *Sh. hanedai* CECT5194 by a SOAT (A); and extracellular antimicrobial activity of selected LAB isolates against *L. monocytogenes* CECT936 by an ADT (B).

Table III.6. Direct and extracellular antimicrobial and anti-*Listeria* activity of the 1,245 LAB isolated from fish, seafood and fish products.

Sample/ Anatomic source	Direct antimicrobial activity ^a			Extracellular antimicrobial activity ^b			Total percentage (%) ^d of isolates or SN			
	No. tested isolates	No. and (%) ^c of isolates		No. tested SN ^b	No. and (%) of SN		with dAA	with eAA	with dA-LA	with eA-LA
		with dAA	with dA-LA		with eAA	with eA-LA				
Squid	90	2 (2.2)	2 (2.2)	2	2 (100)	2 (100)	1.0	8.0	1.0	8.0
Viscera	90	2 (2.2)	2 (2.2)	2	2	2				
Octopus	90	24 (26.7)	17 (18.9)	7	0 (0.0)	0 (0.0)	12.2	0.0	8.6	0.0
Muscle	90	24 (26.7)	17 (18.9)	7	0	0				
Cockle	60	16 (26.7)	15 (25.0)	5	1 (20.0)	0 (0.0)	8.1	4.0	7.6	0.0
Whole specimen	60	16 (26.7)	15 (25.0)	5	1	0				
Mussel	40	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Whole specimen	40	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Swimcrab	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Viscera	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Norway lobster	100	5 (5.0)	5 (5.0)	3	1 (33.3)	1 (33.3)	2.5	4.0	2.5	4.0
Viscera	50	1 (2.0)	1 (2.0)	1	0	0				
Muscle	50	4 (8.0)	4 (8.0)	2	1	1				
Ling	10	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Liver	4	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Viscera	6	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Sardine	90	9 (10.0)	8 (8.9)	3	0 (0.0)	0 (0.0)	4.6	0.0	4.1	0.0
Skin	30	3 (10.0)	3 (10.0)	2	0	0				
Muscle	30	4 (13.3)	3 (10.0)	1	0	0				
Viscera	30	2 (6.7)	2 (6.7)	0	0	0				
Albacore	100	7 (7.0)	7 (7.0)	1	1 (100)	1 (100)	3.6	4.0	3.6	4.0
Skin	50	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Muscle	50	7 (14.0)	7 (14.0)	1	1	1				
Megrim	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Skin	33	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Muscle	33	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Roe	34	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Seabass	100	7 (7.0)	5 (5.0)	6	2 (33.3)	1 (16.6)	3.6	8.0	2.5	4.0
Skin	40	3 (7.5)	2 (5.0)	2	1	1				
Muscle	30	2 (6.7)	2 (6.7)	2	0	0				
Viscera	30	2 (6.7)	1 (3.3)	2	1	0				
Rainbow trout	85	4 (4.7)	4 (4.7)	4	3 (75.0)	3 (75.0)	2.0	12.0	2.0	12.0
Skin	25	2 (8.0)	2 (8.0)	2	1	1				
Muscle	5	2 (40.0)	2 (40.0)	2	2	2				
Viscera	55	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0				
Atlantic salmon	180	73 (40.6)	46 (25.6)	20	12 (60.0)	11 (55.0)	37.1	48.0	23.4	44.0
Cold-smoked	40	29 (72.5)	16 (40.0)	7	6	5	14.7	24.0	8.1	20.0
Marinated	40	14 (35.0)	2 (5.0)	2	1	1	7.1	4.0	1.0	4.0
Fresh Muscle	100	30 (30.0)	28 (28.0)	11	5	5	15.2	20.0	14.2	20.0
Dry-salted cod	100	50 (50.0)	49 (49.0)	13	3 (23.1)	3 (23.1)	25.4	12.0	24.9	12.0
Muscle	100	50 (50.0)	49 (49.0)	13	3	3				
Total n° of isolates	1,245	197 (15.8)	158 (12.7)	64	25 (39.1)	22 (34.4)	100.0	100.0	80.2	88.0

^aDirect antimicrobial activity (dAA) and anti-*Listeria* activity (dA-LA) as determined by a SOAT. ^bExtracellular antimicrobial activity (eAA) and anti-*Listeria* activity (eA-LA) of supernatants (SN) was determined by an ADT. ^c(%) represents the relative percentage of LAB with dAA or dA-LA from each sample and anatomic source. ^dTotal percentage (%) represents the percentage of strains from each sample with dAA, eAA, dA-LA and eA-LA from the total of LAB isolates showing dAA (197) and eAA (25).

Percentages of isolated LAB strains exerting direct antimicrobial activity differed significantly depending on the aquatic species (0.0–25.4%) and/or the anatomic source (0.0–72.5%) (Table III.6; Fig. 3.2). In this respect, 50.0–72.5% of LAB isolated from dry-salted cod and cold-smoked Atlantic salmon, respectively, and 26.7–35.0% of isolates from cockle, octopus and fresh and marinated Atlantic salmon exerted direct antagonistic activity. However, only 2.2–10.0% of isolates from squid,

rainbow trout, Norway lobster, albacore, seabass, and sardine showed antimicrobial activity, and none of the isolates from ling, mussel, swimcrab, and megrim was found to produce clear inhibition zones against the indicator microorganisms employed. Regarding the anti-*Listeria* activity, all the strains with direct antimicrobial activity isolated from squid, rainbow trout, albacore, and Norway lobster exerted antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, while 50–98% of the isolates from seabass, cockle, octopus, sardine, cold-smoked and fresh Atlantic salmon, and dry-salted cod, and only 14.3% of the isolates from marinated Atlantic salmon inhibited this pathogen.

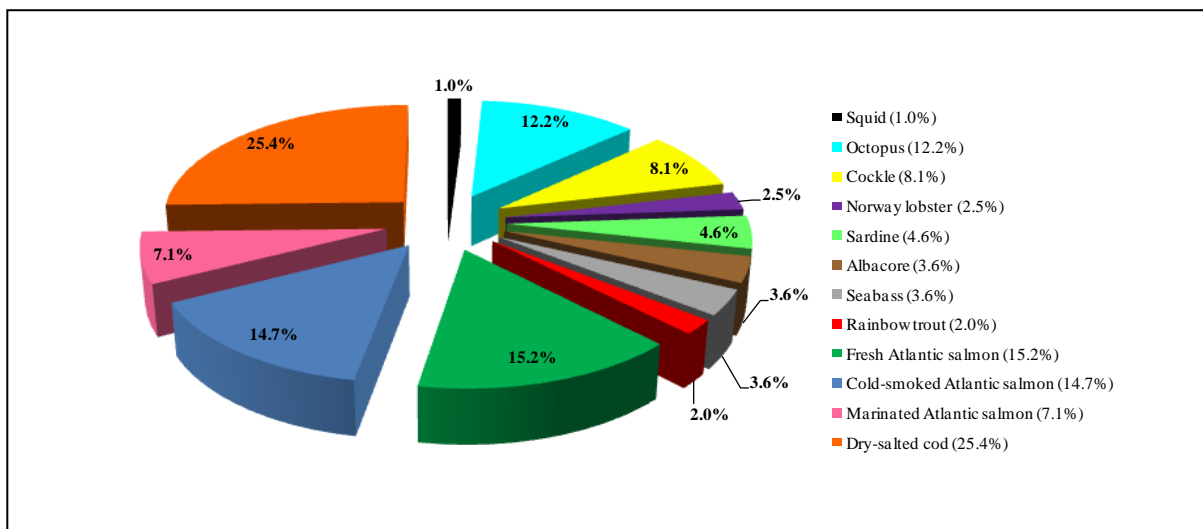


Figure 3.2. Isolation source (%) of the 197 LAB isolates with direct antimicrobial activity.

From the analysis of the antimicrobial activity spectra of the 197 isolates, it can be concluded that some of them show a high similarity, which may reflect that they produce the same antimicrobial compounds. Therefore, according to these results, 64 out of these 197 LAB isolates including representatives of all the identified antimicrobial activity groups, were selected for further identification and characterization.

III.4.2. Screening for bacteriocin-producing LAB

The antimicrobial activity of cell-free culture supernatants from the 64 selected LAB strains against 20 indicator microorganisms was determined by an ADT (Table III.7, Supplemental Data, and Fig. 3.1, panel B). Only 25 isolates, which represent a 39.1%, were found to secrete antimicrobial compounds in their respective cell-free culture supernatants. All the selected LAB strains with direct antimicrobial activity isolated from squid and albacore, 45.5–85.7% from fresh Atlantic salmon, marinated Atlantic salmon, rainbow trout, and cold-smoked Atlantic salmon, and 20.0–33.3% from cockle, dry-salted cod, Norway lobster, and seabass exerted extracellular antimicrobial activity (Table III.6). However, none of the selected LAB strains isolated from octopus and sardine secreted antimicrobial compounds into the liquid growth media, and a single isolate from cockle (strain B11) showed extracellular antimicrobial activity only against one indicator strain. The antimicrobial activity

of these supernatants was sensitive to proteinase K but withstood the heat treatments, suggesting that the inhibitory compounds secreted by these 25 isolates were heat-stable proteinaceous compounds (*i.e.*, bacteriocins). It is noteworthy that all the bacteriocinogenic strains, except the isolates LPV57, B11, and SMA17, exerted extracellular antimicrobial activity against the food-borne pathogenic bacteria *L. monocytogenes*. In contrast, although *Sh. baltica* and *Ps. fluorescens* were inhibited by many of the bacterial cultures, none of these fish spoilage species were sensitive to the respective supernatants.

The antimicrobial activity of the 25 bacteriocinogenic strains against other spoilage and food-borne pathogenic bacteria associated with foods of marine origin such as *L. monocytogenes* and *Cl. botulinum*, as well as microorganisms of health significance as *Staphylococcus* sp. and *Salmonella* spp., was also determined by an ADT (Table III.8, Supplemental Data). All tested supernatants showed antimicrobial activity against some of the *L. monocytogenes* strains used as indicators, except those from isolates LPV57, B11, and SMA17, being remarkable the strong antimicrobial activity exerted by the isolate BCS35. Besides, supernatant from isolate LPV57 only exerted antimicrobial activity against some *Clostridium* spp., supernatant from isolate B11 was not active against any of the 20 indicator microorganisms tested, and supernatant from isolate SMA17 only showed antimicrobial activity against *L. ivanovii* CECT913 and *Cl. botulinum* CECT551. It should be noted that none of the samples were active against *Cl. botulinum* CECT581, *Salmonella* spp. and *St. aureus*.

III.4.3. Taxonomic identification of LAB with direct antimicrobial activity

Biochemical tests revealed that the 64 LAB strains selected for evaluation of bacteriocin production were Gram-positive, catalase negative, facultative anaerobic rods or cocci, with a final pH in their cultures in MRS broth of approximately 4.6, and therefore they were presumed to be LAB. By using biochemical tests specific for the genus *Enterococcus*, it was determined that *Enterococcus* spp. were the predominant LAB (Table III.9). By means of PCR analysis with genus- and species-specific primers (Table III.3), it was shown that 45 isolates produced a PCR fragment of the expected size (112-bp) corresponding to gene *tuf*, and they were thus ascribed to genus *Enterococcus* (Fig. 3.3). From these, 23 strains permitted further amplification of a 550-bp fragment corresponding to *ddl*_{*E.faecium*}, and therefore were assigned to the *E. faecium* species, while 22 strains amplified a 941-bp fragment corresponding to *ddl*_{*E.faecalis*}, being thus classified as *E. faecalis*. Uncertain taxonomical identifications were further established by 16S rRNA gene and/or *sodA* DNA sequencing, showing that all enterococcal strains were correctly identified. Strikingly, the strain LPP29 was not assigned to the genus *Enterococcus* by using genus- and species-specific primers; however, DNA sequencing of *sodA* and 16S rRNA gene and SDS-PAGE analyses demonstrated its identification as *E. faecium*.

The 18 non-enterococcal strains were taxonomically identified by 16S rRNA gene sequencing and/or SDS-PAGE. With regard to this, seven isolates were identified as *Pediococcus pentosaceus*, five isolates as *Weissella cibaria*, three isolates as *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, one isolate as *Lb. sakei* subsp. *sakei*, one isolate as *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, and one isolate as *Leuconosotc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Table III.9 and Figs. 3.4, 3.5 and 3.6).

Table III.9. Biochemical tests and taxonomic identification of the selected 64 LAB isolates.

Sample/ Strain	Bac. activity ^a	Biochemical test ^b			Taxonomic identification ^c				
		KAA	SB	EVA	PCR detection			DNA sequencing	SDS-PAGE
					<i>tuf</i>	<i>ddl E. faecium</i>	<i>ddl E. faecalis</i>	16S rDNA gene	<i>sodA</i>
Squid									
CV1	+++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
CV2	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
Octopus									
P38	-	+	-	-	-	-	-	<i>Weissella cibaria</i>	Nd
P50	-	+	-	-	-	-	-	<i>W. cibaria</i>	Nd
P61	-	+	-	-	-	-	-	<i>W. cibaria</i>	Nd
P622	-	+	-	-	-	-	-	<i>W. cibaria</i>	Nd
P63	-	+	-	-	-	-	-	<i>W. cibaria</i>	Nd
P68	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
P77	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
Cockle									
B5	-	+	-	-	-	-	-	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Nd
B11	+	-	-	-	-	-	-	Nd	Nd
B13	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
B27	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
B43	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus sakei carnosus</i>	Nd
Norway lobster									
CGM16	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
CGM17	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>
CGV67	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
Sardine									
SDP7	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
SDP10	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
SDM37	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>
Albacore									
BNM58	+++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>

Table III.9. Continued.

Sample/ Strain	Bac. activity	Biochemical test		Taxonomic identification							SDS-PAGE	
				PCR detection		DNA sequencing						
		KAA	SB	EVA	tuf	ddl <i>E. faecium</i>	ddl <i>E. faecalis</i>	16S rDNA gene		sodA		
Seabass												
LPP29	+++	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
LPP32	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>P. pentosaceus</i>	Nd	Nd	
LPV46	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>P. pentosaceus</i>	Nd	Nd	
LPV57	+	+	-	-	-	-	-	-	Nd	Nd	<i>P. pentosaceus</i>	
LPM78	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>P. pentosaceus</i>	Nd	Nd	
LPM83	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>P. pentosaceus</i>	Nd	Nd	
Rainbow trout												
TPP2	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
TPP3	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>P. pentosaceus</i>	Nd	Nd	
TPM74	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
TPM76	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
Fresh Atlantic salmon												
SMF4	+++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
SMF8	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
SMF10	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	
SMF19	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	
SMF20	+++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
SMF37	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	
SMF39	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
SMF54	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	
SMF55	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	
SMF60	+++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd	
SMF69	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	-	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd	

Table III.9. Continued.

Sample/ Strain	Bac. activity	Biochemical test			Taxonomic identification					
					PCR detection			DNA sequencing		SDS-PAGE
		KAA	SB	EVA	<i>tuf</i>	<i>ddl E. faecium</i>	<i>ddl E. faecalis</i>	16S rDNA gene	<i>sodA</i>	
Cold-smoked Atlantic salmon										
SMA3	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
SMA7	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
SMA8	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
SMA10	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
SMA17	+	-	-	-	-	-	-	Nd	Nd	<i>Lb. sakei carnosus</i>
SMA36	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
SMA40	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
Marinated Atlantic salmon										
SMM69	-	-	-	-	-	-	-	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>		Nd
SMM73	+	-	-	-	-	-	-	Nd	Nd	<i>Lb. sakei carnosus</i>
Dry-salted cod										
BCS22	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS26	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS27	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS30	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS32	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS35	+++	-	-	-	-	-	-	Nd	Nd	<i>Lactobacillus curvatus</i>
BCS53	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS59	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
BCS60	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS64	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS72	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd
BCS97	++	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	-	Nd	<i>E. faecium</i>	Nd
BCS100	-	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.	-	<i>E. faecalis</i>	Nd	<i>E. faecalis</i>	Nd

^aBacteriocin activity as determined by an ADT, and differentiated as follows: +++: high bacteriocin activity, ++: medium bacteriocin activity, +: low bacteriocin activity. ^bBiochemical tests for the genus *Enterococcus* were carried out by growth on KAA agar at 37°C, SB agar at 45°C and EVA broth at 37°C. ^cTaxonomic identification by PCR with genus (*tuf*)- and species (*ddl*)-specific primers for the genus *Enterococcus*, *sodA* and 16S rRNA gene DNA sequencing and/or SDS-PAGE. ^dNd, not determined.

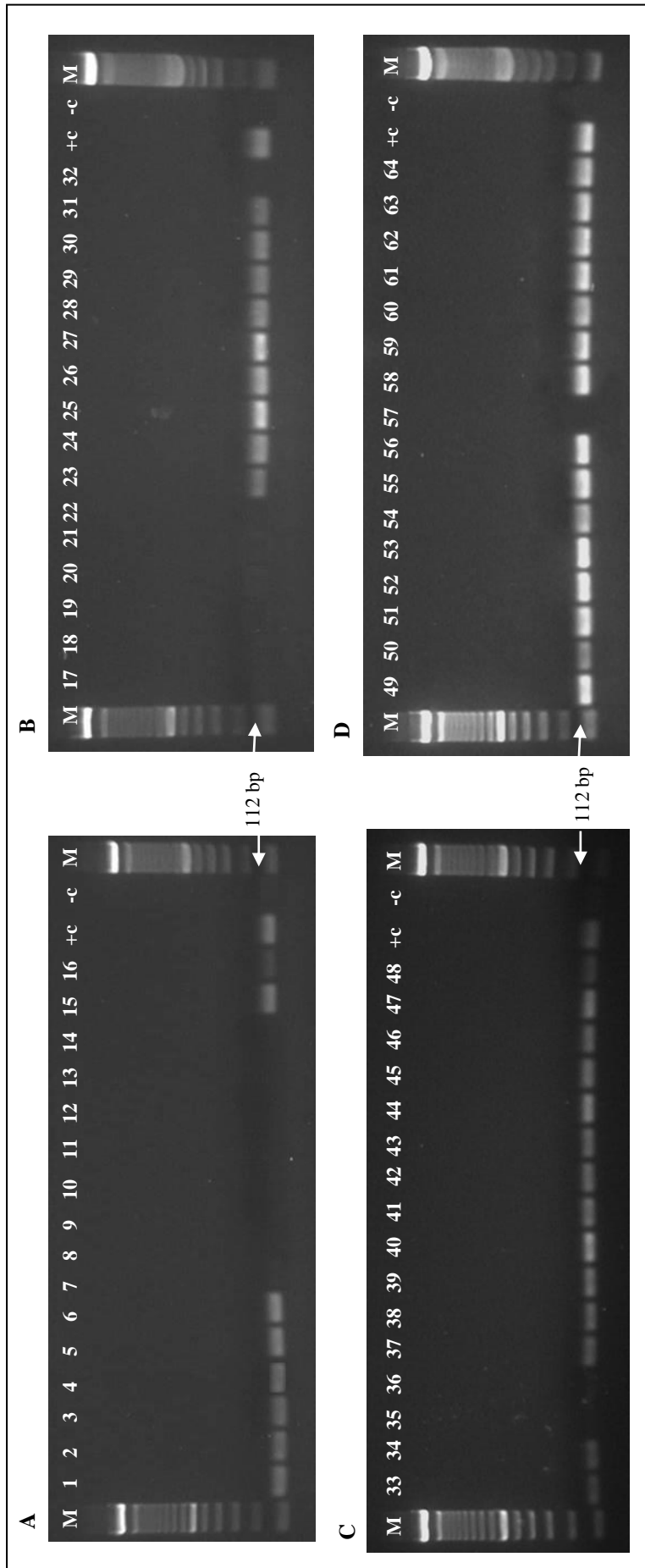


Figure 3.3. PCR-based identification of *Enterococcus* spp. amongst the 64 selected LAB isolated from squid, rainbow trout, seabass and cockle (A); octopus, sardine and cold-smoked Atlantic salmon (B); cold-smoked, marinated and fresh Atlantic salmon and albacore (C), and Norway lobster and dry-salted cod (D). Lanes: 1-16, test reactions using genomic DNA from CV1 (1), CV2 (2), TPP2 (3), TPP3 (4), TPM74 (5), TPM76 (6), LPP29 (7), LPP32 (8), LPV46 (9), LPV57 (10), LPM78 (11), LPM83 (12), B5 (13), B11 (14), B13 (15) and B27 (16); Lanes: 17-32, test reactions using genomic DNA from B43 (17), P38 (18), P50 (19), P61 (20), P62 (21), P63 (22), P68 (23), P77 (24), SDP7 (25), SDP10 (26), SDP10 (26), SDP10 (26), SMA3 (28), SMA7 (29), SMA8 (30) SMA10 (31) and SMA17 (32); Lanes: 33-48, test reactions using genomic DNA from SMA36 (33), SMA40 (34), SMM169 (35), SMM73 (36), SMF4 (37), SMF8 (38), SMF10 (39), SMF19 (40), SMF20 (41), SMF37 (42), SMF39 (43), SMF54 (44), SMF60 (46), SMF69 (47) and BNM58 (48); Lanes: 49-64, test reactions using genomic DNA from CGM16 (49), CGM17 (50), CGV67 (51), BCS22 (52), BCS26 (53), BCS27 (54), BCS30 (55), BCS32 (56), BCS35 (57), BCS53 (58), BCS59 (59), BCS60 (60), BCS64 (61), BCS72 (62), BCS97 (63) and BCS100 (64); +c, positive control reaction using genomic DNA from *E. faecium* P13; -c, negative control reaction using genomic DNA from *P. acidilactici* 347; M, 100-bp DNA ladder (Invitrogen Corp.; San Diego, CA, USA).

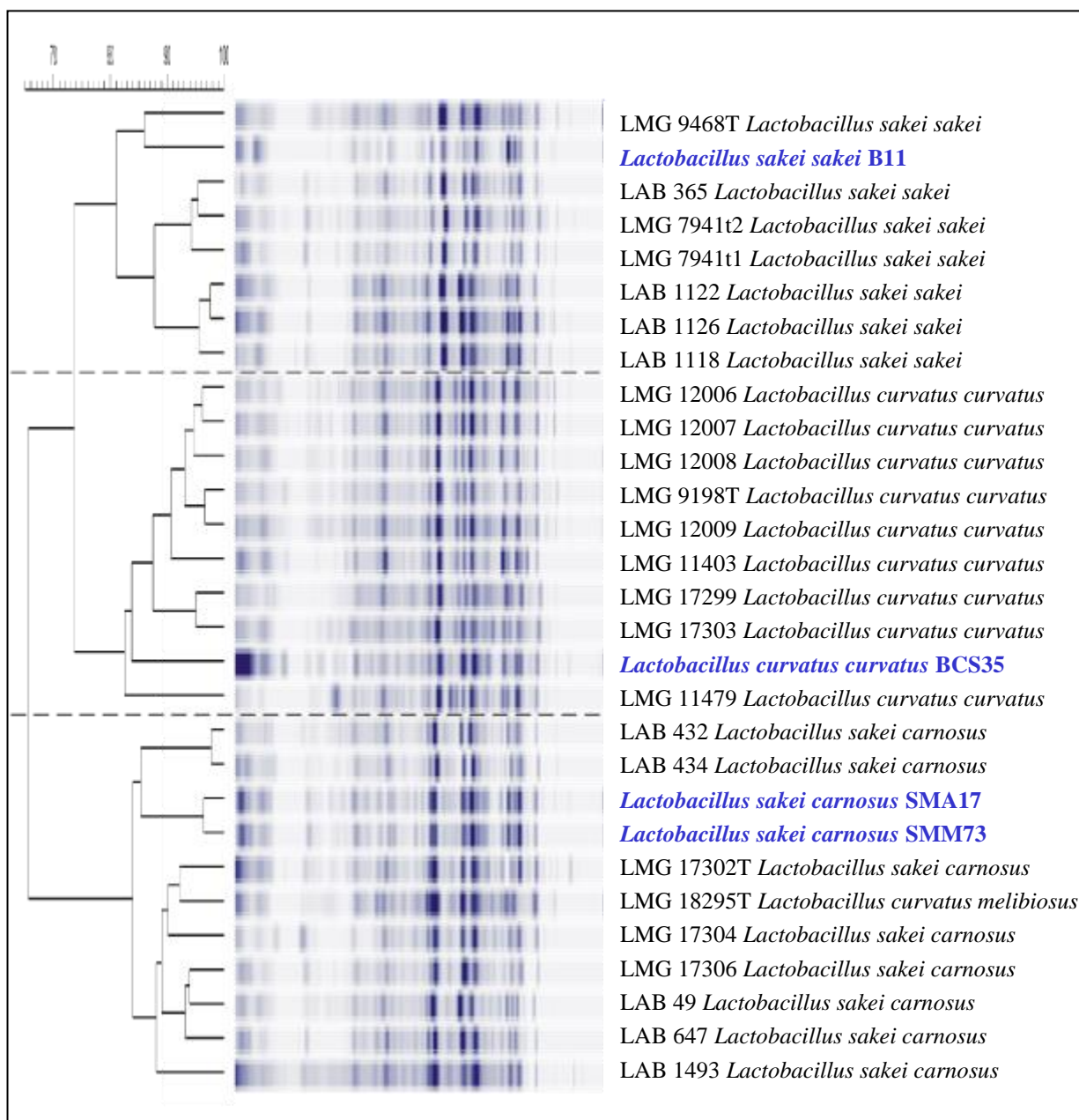


Figure 3.4. Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of *Lactobacillus sakei sakei* B11, *Lactobacillus curvatus curvatus* BCS35, and *Lactobacillus sakei carnosus* SMA17 and SMM73.

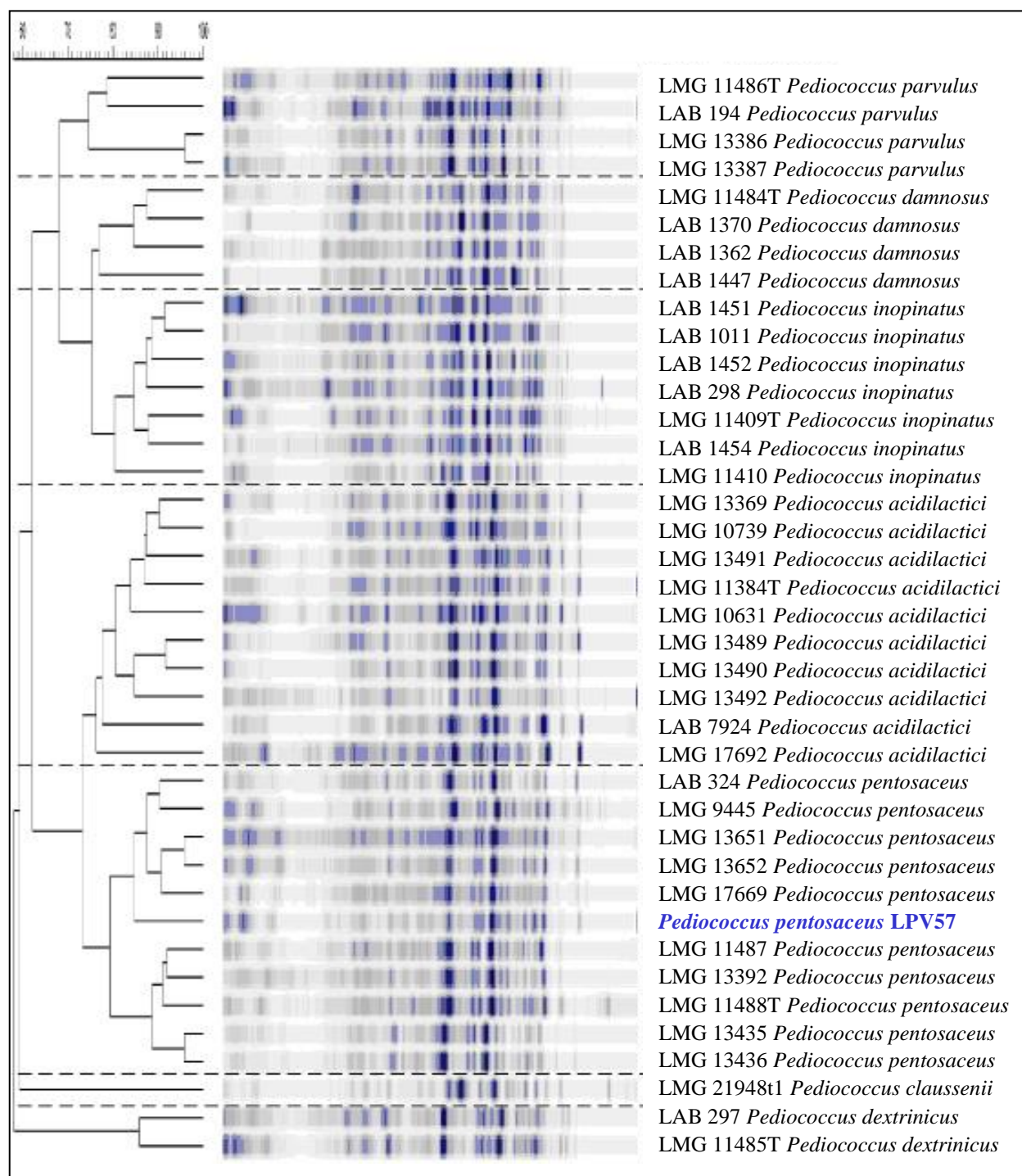


Figure 3.5. Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of *Pediococcus pentosaceus* LPV57.

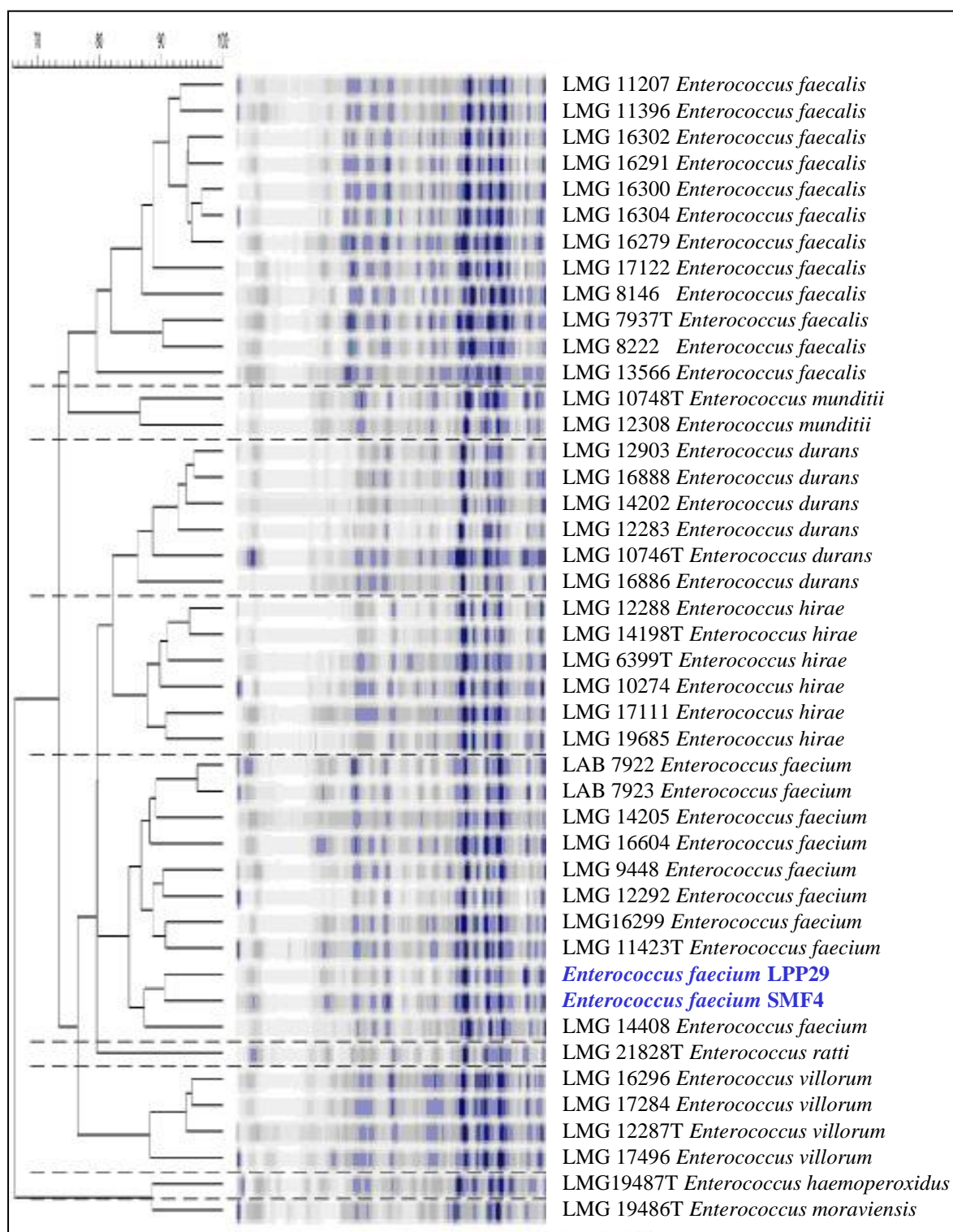


Figure 3.6. Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of *Enterococcus faecium* LPP29 and SMF4.

III.4.4. Detection of enterocin structural genes in *Enterococcus* spp. isolates

The presence of structural genes encoding previously described enterocins in the 20 bacteriocinogenic *E. faecium* isolates is summarized in Table III.10. By using enterocin specific primer pairs, all *E. faecium* isolates allowed the amplification of fragments of the expected size, except *E. faecium* LPP29 and *E. faecium* SMA10. *E. faecium* CV1, CV2, TPP2, TPM74, TPM76, SMA7, SMA8, CGM17 and BCS59 amplified either a 216- and/or a 286-bp fragment corresponding to enterocin P (*entP*) and enterocin L50 (*entL50A-entL50B*), respectively. The isolates *E. faecium* SMA36 and SMA40 were the only strains that amplified a 250-bp fragment of hiracin JM79 (*hirJM79*). The strains *E. faecium* SMF4, SMF20, and SMF60 amplified a 172-bp fragment of enterocin A (*entA*), a 126-bp fragment of enterocin B (*entB*), a 408-bp fragment of enterococcin V583 (*ef1097*), and a 324-bp fragment of the cytolysin (bacteriocin-hemolysin) precursor (*cyl_{LS}*). The isolates *E. faecium* SMF8, SMF39, BNM58, and BCS97 amplified a 216-bp fragment of enterocin P (*entP*), a 286-bp fragment of enterocin L50 (*entL50A-entL50B*), and a 105-bp fragment of enterocin Q (*entqA*). None of the tested enterococcal strains allowed the amplification of the structural genes of enterocin AS-48 (*entAS-48*), enterolysin A (*entL*), and enterocin 1071 (*ent1071A-ent1071B*).

Concerning the occurrence of different enterocin structural gene combinations in the tested isolates, the one with the highest occurrence was that of *entP* with *entL50A* and *entL50B* (35%, 7 strains), followed by these genes together with *entqA* (20%, 4 strains), and the combination of *entA*, *entB*, *ef1097* and *cyl_{LS}* (15%, 3 strains). A single strain (5%) harboured *entL50A* and *entL50B* with *hirJM79* (Table III.10 and Fig. 3.7).

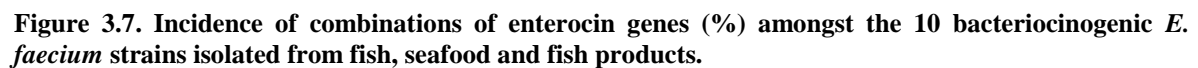
III.4.5. *In vitro* safety aspects of the bacteriocinogenic enterococcal LAB

The results of the *in vitro* safety evaluation of the 20 *E. faecium* strains by means of PCR-detection of genes encoding potential virulence factors, phenotypic analysis of hemolysin, gelatinase and protease production, and antibiotic susceptibility testing are shown in Table III.10. All the *E. faecium* isolates except two (strains LPP29 and SMA10), amplified a 735-bp fragment encoding the cell wall adhesin (*efaAfm*), and all but five (strains LPP29, SMA7, SMA10, SMA36 and SMA40) also amplified a 543-bp fragment of the sex pheromone gene *ccf*. Interestingly, the strains *E. faecium* LPP29 and *E. faecium* SMA10 did not show any amplification fragment. The isolates *E. faecium* SMF4, *E. faecium* SMF20, *E. faecium* SMF39 and *E. faecium* SMF60 amplified most of the genes encoding virulence factors, including a 419-bp fragment of *gelE*, 782- and 543-bp fragments of the sex pheromone genes *cpd* and *ccf*, 735- and 705-bp fragments encoding *efaAfm* and *efaAfs*, and a 1,553-bp fragment of *agg*. Moreover, these strains were shown to contain some of the genes involved in the synthesis (*cyl_{LS}*), intracellular modification (*cylM*), transport (*cylB*) and/or exocellular activation (*cylA*) of a cytolysin-hemolysin from *E. faecalis*. On the other hand, none of the tested enterococcal strains allowed the amplification of the genes encoding the enterococcal surface protein (*esp*) and a sex pheromone (*cob*). Interestingly, all the *E. faecium* isolates were phenotypically hemolysin, gelatinase, and protease negative. Phenotypes recorded from the antimicrobial susceptibility tests revealed that all

Table III.10. Enterococin genotype, virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of the 20 bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* isolates.

Strain	Enterococin genotype ^a	Virulence factors ^b		Antibiotic susceptibility patterns ^c		
		Genotype	Phenotype	R	I	S
<i>E. faecium</i> CV1	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	ERY, KAN	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> CV2	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	ERY, KAN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> TTP2	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	KAN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, ERY, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> TPM74	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	KAN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, ERY, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> TPM76	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	KAN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, ERY, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> LPP29	-	-	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	-	PEN, AMP, VAN, TPL, ERY, TET, CMP, FUS, KAN, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> SMA7	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMA8	<i>entL50A-entL50B, entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, GEN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMA10	-	-	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, GEN, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMA36	<i>hirJM79</i>	<i>efaAfm</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMA40	<i>entL50A-entL50B, hirJM79</i>	<i>efaAfm</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMF4	<i>entA, entB, efI097, cvlL_{LS}</i>	<i>cvlM, cvlB, cvlA, ags, gelE, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	TET, KAN, STR, CIP, NOR, NAL, RIF	ERY, FUS, GEN	PEN, AMP, VAN, TPL, CMP, GEN*, CLL, NIT
<i>E. faecium</i> SMF8	<i>entL50A-entL50B, entP, entqA</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, GEN	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> SMF20	<i>entA, entB, efI097, cvlL_{LS}</i>	<i>cvlM, cvlA, ags, gelE, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	TET, KAN, STR, NOR, NAL, RIF	ERY, GEN, CIP, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, CMP, FUS, GEN*, CLL
<i>E. faecium</i> SMF39	<i>entL50A-entL50B, entP, entqA</i>	<i>cvlA, gelE, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY, FUS, NIT	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF
<i>E. faecium</i> SMF60	<i>entA, entB, efI097, cvlL_{LS}</i>	<i>cvlM, cvlA, ags, gelE, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	TET, KAN, STR, CIP, NOR, NAL, RIF	ERY, GEN	PEN, AMP, VAN, TPL, CMP, FUS, GEN*, CLL, NIT
<i>E. faecium</i> BNMS8	<i>entL50A-entL50B, entP, entqA</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	CLL, STR, NAL	ERY, KAN	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> CGM17	<i>entL50A-entL50B</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> BCSS9	<i>entP</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT
<i>E. faecium</i> BC97	<i>entL50A-entL50B, entP, entqA</i>	<i>efaAfm, ccf</i>	Gel ⁺ , Hly ⁺ , Prt ⁺	KAN, CLL, STR, NAL	ERY	PEN, AMP, VAN, TPL, TET, CMP, FUS, GEN, GEN*, CIP, NOR, RIF, NIT

^aEnterococin genotype of the enterococcal strains determined by PCR with specific primers for previously described enterococins. ^bPCR detection of genes encoding potential virulence factors in the enterococcal strains and gelatinase (Gel), hemolysin (Hly) and protease (Prt) production. The susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) phenotypes to each antibiotic were determined by the disk diffusion method measuring the diameter of the inhibition zones, in mm, and results interpreted according to the standards for enterococci established by the CLSI (2003, 2011). Antibiotic abbreviations: penicillin (PEN), ampicillin (AMP), vancomycin (VAN), teicoplanin (TPL), erythromycin (ERY), tetracycline (TET), chloramphenicol (CMP), fusidic acid (FUS), kanamycin (KAN), gentamicin (10 µg GEN), gentamicin (120 µg GEN), streptomycin (STR), ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), nalidixic acid (NAL), rifampin (RIF) and nitrofurantoin (NIT).



The immunity of the 25 bacteriocinogenic LAB strains to their own bacteriocins and their sensitivity/resistance to the heterologous bacteriocins were determined by an ADT (Table III.11, Supplemental Data). The 25 bacteriocinogenic strains were also challenged against LAB strains producing previously characterized bacteriocins. The results obtained showed that, as expected, the 25 bacteriocinogenic strains were insensitive to their own bacteriocins. *E. faecium* isolates containing the structural genes of enterocins L50, P and Q (strains SMF8, SMF39, BNM58 and BCS97) showed a similar inhibitory spectrum, and were only inhibited by the non-enterococcal isolates and those enterococci with the genetic determinants for enterocin A, B and enterococcin V583 (strains SMF4, SMF20 and SMF60). Besides, *E. faecium* SMF4, *E. faecium* SMF20 and *E. faecium* SMF60 were immune to the bacteriocins produced by each other, but inhibited by all the supernatants tested except those from *P. pentosaceus* LPV57, *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17 and *Lb. sakei* SMM73. The *E. faecium* isolates with the genetic determinants for enterocin L50 and/or enterocin P (strains CV1, CV2,

TPP2, TPM74, TPM76, SMA7, SMA8, CGM17 and BCS59) presented different inhibitory spectra, being remarkable that *E. faecium* BCS59 was inhibited by all the supernatants tested except those of *P. pentosaceus* LPV57 and *Lb. sakei* B11, while *E. faecium* CV1 and TPP2 were sensitive to all but 3 supernatants (*E. faecium* CV2, *P. pentosaceus* LPV57 and *Lb. sakei* B11). Interestingly, *E. faecium* SMA8 and *E. faecium* SMA10 were only inhibited by *P. pentosaceus* LPV57. Amongst the non-enterococcal isolates, *Lb. curvatus* BCS35 was only inhibited by supernatants from *E. faecium* SMF8, *E. faecium* BNM58 and *E. faecium* BCS97 (strains containing the structural genes of enterocins L50, P and Q) and from *E. faecium* CGM17 (containing the structural gene of enterocin L50). *Lb. sakei* SMA17 and *Lb. sakei* SMM73 were immune to the bacteriocins produced by each other and only insensitive to the supernatants from *P. pentosaceus* LPV57 and *E. faecium* CV1.

III.5. DISCUSSION

All food commodities have their own characteristic microbiota, which is determined by the raw material used, the handling process and the storage conditions (Gram and Dalgaard, 2002). Fish as raw material is not a well defined group since it covers an enormous range of species which can be harvested from a wide range of environments (fresh or salt waters, traditional fishing or aquaculture, tropical or arctic waters, pelagic swimmers or demersal residents) (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumer, 1998). Besides, the variety of the used microbiological sampling techniques, including culture-dependent and -independent methods, has resulted in a high number of reports on the quantitative fish microbial populations, with a very diverse range and numbers of microorganisms isolated from fish (Shewan, 1962; Liston, 1980; Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumer, 1998; Austin, 2002; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2005). Many different microorganisms can be found on the outer surfaces of fish (skin and gills) and in the intestine of live and newly caught fish. Due to the poikilotherm nature of fish, which allows bacteria with a broad temperature range to grow, the microbiota of temperate water fish is dominated by psychrotrophic Gram-negative bacteria, belonging to the genera *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, and *Aeromonas*, but Gram-positive organisms such as *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Corynebacterium* can also be found in varying proportions. Interestingly, tropical fish microbiota contains a slightly higher load of Gram-positive and enteric bacteria, being otherwise similar to that of temperate water fish (Gram and Huss, 1996).

It is generally accepted that the bacterial microbiota of newly-caught fish depends on its capture environment rather than on the fish species (Shewan, 1977; Huss, 1995; Austin, 2002). The time elapsed between sample collection and examination is also an important factor in fish microbial load. In this respect, it is common to transport fish on ice, cooled or at room temperature, to distant laboratories for examination, and this may influence the microbial countings of the samples. In our study, all the samples were collected from retail fish markets or supermarkets, so the steps from catch through processing and distribution to the consumer should be taken into account. With regard to this, in an early study, Liston (1980) reported a range of 10^2 – 10^7 cfu/cm² on the fish skin surface; however,

in a more recent study, Austin (2002) found that fish has only low bacterial populations on the skin (ca., 10^2 to 10^4 cfu/cm²), and that the bacterial population size reflects the level of water pollution. In our study, total microbial counts for seabass and rainbow trout skins were in the range reported by Austin (2002); however, sardine, albacore, and megrim skins showed higher microbial loads, which could reflect the different origins of the samples (traditional fishing vs. aquaculture). On the other hand, gills and intestine can contain microbial loads of 10^3 – 10^9 cfu/g (Shewan, 1962; Austin, 2002). Interestingly, microbial loads found in the viscera in our study were in the range of previous studies except for the aquaculture rainbow trout, which were much lower. This discrepancy may be explained to some extent by the fact that in the aquaculture industry it is possible to manipulate the microbiota of the developing fish by the use of antibiotics, vaccines, and/or probiotics (González *et al.*, 1999; Austin, 2002; Ringø *et al.* 2005). Concerning fish muscle, it has been reported that the flesh of healthy live or newly-caught fish is sterile, since the immune system prevents bacteria from growing (Huss, 1995; Fraser and Sumar, 1998). However, our results showed that muscles of all tested samples were not sterile as the bacterial levels achieved counts up to 10^6 cfu/g. This can be related to the fact that this regulatory mechanism cease after dead, and bacteria invade the muscle of the fish through the skin during storage by moving across the muscle fibers. Finally, internal organs, such as kidney and liver of healthy fish may also contain bacteria (Toranzo *et al.*, 1993; Apun *et al.*, 1999; Austin 2002). In this respect, bacteria were also found in the liver and roe of ling and megrim, respectively.

Despite of the high variability in fish microbiota, various authors have shown that LAB constitute part of the normal intestinal microbiota of fish. The first study reporting that fish may contain lactobacilli on the skin, gills, and gut was published by Dyer (1947) on Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Later on, Kraus (1961) reported the isolation of lactobacilli from fresh herring (*Clupea harengus*), and Kvasnikov *et al.* (1977) described the presence of LAB in the intestine of various fish species inhabiting ponds at larval, fry, and fingerling stages, and provided information on the changes in their composition as a function of the season of the year and life-stage of the fish. More recently, the presence of *Carnobacterium* in the digestive tract of fish has also been reported (Baya *et al.*, 1991; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Ringø, 2008). In this context, *C. maltaromaticum* and, to a lesser extent, *C. divergens* are considered part of the normal intestinal microbial population of many fish species such as Atlantic salmon (*Salmo salar*), wild pike (*Esox lucius*), and wild brown trout (*Salmo trutta*) (Ringø and Gatesoupe, 1998; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000). In our study, LAB populations were found in all the fresh fish samples (except viscera of ling). On the other hand, RTE products have their own microbiota, which is mainly selected by the preservation conditions used. The preservation effect of sodium chloride (NaCl) is primarily due to the reduction of water activity (a_w) which renders the fish product unsuitable for microbial proliferation. In dry-salting, the fish is covered with an amount of salt corresponding to 5–10% (wt/wt) of the fish weight. However, the ability of some LAB to grow in relatively high NaCl concentrations has been reported (Korkeala *et al.*, 1992; Lyhs, 2002). Cold-smoked fish is processed at smoking temperatures not higher than 28°C, with NaCl levels of 2 to 3% (wt/wt), and the resulting product is often vacuum-packaged. The cold-smoked process does not destroy the natural microbial population or psychrotrophic pathogens of the raw fish, and for that

reason the end products must be stored at chilled temperatures (Lyhs, 2002). Under these conditions, the microbiota typically becomes dominated by LAB after 1–2 weeks of storage at 5°C (Leisner *et al.*, 1994; Truelstrup Hansen *et al.*, 1995; Østergaard, 1998; Gram and Dalgaard, 2002). Marinating means curing raw or cooked fish in a low pH (below 5.0) solution containing acetic acid, salt, and sometimes spices. In semi-preserved marinated fish, the nature of the marinating process inhibits the Gram-negative spoilage bacteria but not the LAB, which may spoil the product if not correctly manufactured and stored (Lhys, 2002). In our study, the RTE samples of cold-smoked and marinated Atlantic salmon showed the highest incidence of LAB (89.1 and 80.7% respectively), revealing that these are the dominating bacteria, as previously described by Gram and Dalgaard (2002). However, LAB only represented a 6.3% from the total bacterial population in dry-salted cod.

Although isolation and characterization of LAB with antimicrobial activity from fish and fish products have been previously described, these studies have been generally focused on cultured and freshwater fish (Ringø and Gasteoupe, 1998; Gasteoupe, 1999; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Hagi *et al.*, 2004; Bucio *et al.*, 2006) and fermented fish (Cai *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2005). Strikingly, although marine fish may contain LAB, studies on the isolation and characterization of strains with antimicrobial activity are scarce (Seppola *et al.*, 2006; Desriac *et al.*, 2010). In our study, the direct antimicrobial activity of 1,245 LAB isolates from fish, seafood and fish products was evaluated against 20 indicator microorganisms including several *Listeria* species as well as other Gram-positive and Gram-negative food-borne pathogenic microorganisms of concern for the food industry, and the human and animal health. Our results show that 15.8 % of the isolates (197 strains) exerted direct antimicrobial activity against, at least, one of the tested indicator microorganisms. None of the isolates from mussel, ling, swimcrab, megrim, viscera of rainbow trout, and skin of albacore, showed antimicrobial activity. Interestingly, the RTE products (cold-smoked and marinated Atlantic salmon, and dry-salted cod), mainly the cold-smoked salmon, were the samples with the highest percentages of isolates showing direct antimicrobial activity (72.5, 35 and 50%, respectively). A relevant and commonly targeted microorganism is *L. monocytogenes*, as it has been frequently isolated from RTE seafood products like vacuum-packed cold-smoked fish (FAO/WHO, 2004). Regarding the direct anti-*Listeria* activity of the LAB isolated in this study, the samples with the highest percentage of isolates with direct antimicrobial activity against this food-borne pathogen were dry-salted cod (49%), cold-smoked and fresh Atlantic salmon (40 and 28% respectively), and cockle (25%). In total, from the 197 isolates with direct antimicrobial activity, 80.2% showed direct anti-*Listeria* activity. With regard to undesirable psychrotolerant Gram-negative spoiler microorganisms such as *Pseudomonas* spp. and *Shewanella* spp., 77.7% of the isolates in our study showed direct antimicrobial activity against, at least, one of the tested strains. These Gram-negative microorganisms are able to grow on chilled fish and are the specific spoilers of marine tropical fish stored in ice (Gram, 1992; Huss, 1995, Gram and Huss; 1996). *Sh. putrefaciens* is also the specific spoilage bacteria of marine temperate-water fish stored aerobically in ice and under vacuum, being able to grow to levels of 10^6 – 10^8 cfu/g (Gram and Huss, 1996). Besides, *Sh. putrefaciens* and also *Sh. algae* are human pathogens which have been associated with infections involving ears, skin, and soft tissue (Richards *et al.*, 2008).

Other *Shewanella* spp., especially *Sh. baltica*, are commonly associated with food spoilage (Richards *et al.*, 2008). The inhibition of Gram-negative bacteria by LAB has been previously described, and several studies have demonstrated that non-bacteriocinogenic LAB have acid-independent antibacterial properties (Leroi *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 1999, 2005). However, in the last years some studies have reported bacteriocins showing antimicrobial activity against Gram-negative microorganisms such as *Campylobacter* spp. or *Salmonella* spp. (Line *et al.*, 2008; Svetoch *et al.*, 2008, 2011; Messaoudi *et al.*, 2012; de la Fuente-Salcido *et al.*, 2012).

The evaluation of the extracellular antimicrobial activity of the selected 64 LAB strains showing direct antimicrobial activity revealed that only 39.1% (25 strains) secreted antimicrobial compounds in their cell-free culture supernatants. The inhibitory substances produced by the 25 strains were inactivated by proteinase K but withstood several heat treatments, confirming their proteinaceous nature (*i.e.*, bacteriocins). Regarding the bacteriocin activity against *L. monocytogenes*, we found a high frequency of active isolates (88%), which is in agreement with the results previously described by Pinto *et al.* (2009) when analyzing a LAB collection isolated from seafood. However, Østergaard *et al.* (1998) reported low frequencies of anti-listerial isolates in Thai fermented fish products, and Alves *et al.* (2005) found that only a few bacteriocinogenic strains isolated from Brazilian smoked fish (identified as *Carnobacterium piscicola*) were able to inhibit *L. monocytogenes*. It should be noted that none of the *E. faecalis* isolates with direct antimicrobial activity was found to secrete bacteriocins under the experimental conditions used in this study.

Evaluation of the self- and cross-immunity of the 25 bacteriocinogenic LAB showed that all the strains were immune to their own bacteriocins as well as, in some cases, to the heterologous bacteriocins. In this respect, strains producing a bacteriocin would be expected to be insensitive to their own bacteriocin (self-immunity) (Fimland *et al.*, 2002). Therefore, if a bacteriocin-producing strain or its cell-free culture supernatant inhibits another bacteriocin-producing strain, it suggests that (at least one of) the bacteriocin(s) produced by the former strain is/are not produced by the second strain. Oppositely, the absence of inhibition of the indicator culture by the producer strain indicates that the secreted inhibitory activity is ineffective, or that the indicator strain is immune because it produces an identical or almost identical bacteriocin. Cross-immunity for bacteriocins belonging to different groups does occur but only if their immunity proteins belong to the same group (Fimland *et al.*, 2002). It is worth mentioning that this approach has been proved useful to identify LAB producing previously described and novel bacteriocins (Hartnett *et al.*, 2002).

A considerable diversity of LAB associated with fish, fish products and fish environments has been previously reported, although *Carnobacterium* spp. has been identified as the dominant genus in most studies (Alves *et al.*, 2005; Bucio *et al.*, 2006; González *et al.*, 1999, 2000; Pinto *et al.*, 2009; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Seppola *et al.*, 2006). In our study, the taxonomic identification of selected 64 LAB with direct antimicrobial activity showed that no *Carnobacterium* spp. were isolated; however, bacteria belonging to the genus *Enterococcus* represented 71.9% (46 strains), and were present in all the samples except marinated Atlantic salmon. Despite the fact that *E. faecalis*, *E.*

faecium, and other enterococci have not been generally considered as a part of the indigenous microbiota of the fish gut (Ringø and Gatesoupe, 1998), Cai *et al.* (1999) reported the isolation of small numbers of enterococci from the intestine of common carp and freshwater prawns, and González *et al.* (1999) isolated enterococci from skin, gills, and gut of brown trout, wild pike, and aquacultured rainbow trout. Moreover, González *et al.* (2000) isolated 249 LAB strains from freshwater fishes and their surrounding habitats, eight of which were ascribed to the genus *Enterococcus*. On the other hand, Michel *et al.* (2007) used amplified rDNA gene restriction analysis (ARDRA) to elucidate the nature and prevalence of different fish-associated bacteria belonging to the LAB group, revealing the existence of 12 distinct clusters, two of which included typical enterococci that could not be characterized at the species level by ARDRA. Besides, some isolates were representative of the *E. faecium* group, and the strains within *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* species were only characterized by their *sodA* sequences. Furthermore, Petersen and Dalsgaard (2003) detected a high prevalence of *E. faecium* isolates in fish intestinal samples from traditional fish farms, suggesting that enterococci may be members of the normal intestinal microbiota of fish. Recently, Valenzuela *et al.* (2010) reported the isolation and identification of 24 *E. faecium* strains from a variety of seafood samples, mainly fish fillets, suggesting that these enterococci could reach the seafood from the intestines during fish evisceration or due to cross-contamination during handling and processing. In our study, enterococci showing direct antimicrobial activity were identified as *E. faecium* (52.2%) and *E. faecalis* (47.8%); however, it should be noted that none of the *E. faecalis* isolates were found to secrete bacteriocins under the stated experimental conditions. Although this observation has been previously reported, the mechanism responsible for the lack of bacteriocin activity in strains within this species remains unraveled (Citti, 2005; Martín, 2006; Poeta *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007a; Sánchez, 2008; Valenzuela *et al.*, 2010). Bacteriocin producing enterococci have been previously isolated from seafood and fish products (Pinto *et al.*, 2009; Tomé *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2010; Todorov *et al.*, 2011b), and likewise 83.3% of *E. faecium* isolates (20 out of 24 strains) characterized in our study exerted bacteriocin activity.

Regarding the occurrence of enterocin structural genes in the 20 bacteriocinogenic *E. faecium* strains, the genes encoding EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP were the most abundant (65 and 60%, respectively), either alone or in combination with other enterocin structural genes. In this respect, our results reveal a high incidence of strains (80%) harboring two to four genes encoding enterocins, in particular those encoding *entL50* (*entL50A-entL50B*) and *entP*, suggesting a high genetic potential of enterococcal strains to produce various bacteriocins, which is in agreement with the results of previously studies (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998a, 2000b; Poeta *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007b; Brandão *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011). Although the structural genes *efl097* and *cylL_{LS}* have been mostly detected in *E. faecalis*, our findings support the idea that they can be found in other bacterial species, such as *E. faecium* (Hickey *et al.*, 2003; Nilsen *et al.*, 2003; Semedo *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2007; Swe *et al.*, 2007). Moreover, our study describes for the first time the isolation of putative multibacteriocinogenic *E. faecium* strains harbouring not only *efl097* and *cylL_{LS}*, but also *entA* and *entB*. In addition, a putative multibacteriocinogenic *E. faecium* strain harbouring *entL50*

(*entL50A-entL50B*) and *hirJM79* has been identified. The simultaneous presence of *hirJM79* and structural genes encoding enterocins previously described in *E. faecium* (*entP*, *entqA*, *entA* and/or *entB*) is more common than it would be expected, as it has been also described in many strains of this species isolated from humans, pets, game animals and saltwater fish (Brandão *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011). The cytolysin (Cyl_{LS}) is considered a unique bacteriocin as it exhibits both hemolytic and bactericidal activities (Nes *et al.*, 2007). Its expression, maturation, secretion and activation require the presence of the complete *cyl* operon, which contains two cytolysin structural subunits, designated *cylL* and *cylS*, encoding for peptides of 68 and 63 amino acids, respectively. These subunits are posttranslationally modified intracellularly by *cylM* gene product, and transported out of the cell by an ATP-binding cassette transporter (ABC transporter) encoded by *cylB*; after externalization, cytolysin precursor components are activated by *cylA* which encodes an extracellular activator serine protease (Semedo *et al.*, 2003; Shankar *et al.*, 2004). Interestingly, in our study, none of the three tested bacteriocinogenic *E. faecium* strains harboring *cyl_{LS}* exerted β -hemolytic activity. With regards to this, two out of three strains lack the ABC transporter encoded by *cylB*, which may explain the absence of β -hemolytic activity. Moreover, the only *E. faecium* strain harboring the complete *cyl* operon, did not show β -hemolytic activity, which may reflect the existence of silent bacteriocin genes, a phenomenon that has been previously described in enterococci (Eaton and Gasson, 2001; Semedo *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2007). On the other hand, the absence of genes encoding known enterocins in two bacteriocinogenic *E. faecium* strains, isolated from seabass and cold smoked Atlantic salmon, suggests the production of, at least, two novel bacteriocins.

The genus *Enterococcus* is the most controversial group of LAB and, contrary to other genera such as *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus*, it has not been awarded the QPS (Qualified Presumption of Safety) status by the European Food Safety Agency (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007; EFSA, 2011). Enterococci are widely distributed in the environment (*e.g.*, gastrointestinal tract of human and animals, plants, water and soil), probably as a result of their natural tolerance to adverse environmental conditions (Giraffa, 2002; Ogier and Serror, 2008). They are also associated with foods such as milk, cheese, meat, vegetables, and fish, and they may play a beneficial role in numerous fermented foods. Moreover, some enterococcal strains have been successfully used as human probiotics and feed additives in animal nutrition (Franz *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2008). Nevertheless, in the last decade, enterococci have become important nosocomial pathogens and have been associated with a number of human infections such as urinary tract infections, endocarditis and bacteremia (Hunt, 1998; Morrison *et al.*, 1997). The overgrowing concerns about the genus *Enterococcus* are emphasized by the fact that particular strains exhibit acquired and transferable (multiple) antibiotic resistances. In this respect, enterococci may have acquired genetic determinants conferring resistance to many classes of antibiotics, such as (i) beta-lactams; (ii) tetracyclines; (iii) aminoglycosides (high level); (iv) chloramphenicol; (v) streptogramins; (vi) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin); (vii) macrolides; (viii) fusidic acid; (ix) quinolones; (x) lincosamides, (xi) trimethoprim/sulfamethoxazole; (xii) rifampicin; (xiii) nitrofurantoin, and (xiv) to the synergistic action of beta-lactams and aminoglycosides (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*,

2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Ogier and Serror, 2008). In particular, vancomycin-resistant enterococci (VRE) pose a major problem in treating human clinical infections. Vancomycin resistance can be intrinsic (*vanC*) or acquired (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG* and *vanM*) (Klare *et al.*, 2003; Ogier and Serror, 2008; Xu *et al.*, 2010). The most frequent transferable vancomycin-resistant phenotypes is VanA, which is associated with a high level of inducible resistance to vancomycin and cross-resistance to other glycopeptides such as teicoplanin and avoparcin, and VanB, which usually displays variable levels of inducible resistance to only vancomycin. These phenotypes are also of the highest clinical importance as they are the most frequently observed in the two predominant enterococcal species, *E. faecalis* and *E. faecium* (Vancanneyt *et al.*, 2002; Klare *et al.*, 2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Ogier and Serror, 2008). A number of studies have attempted to compare the resistance spectra of different enterococci according to their human, animal or food origin (Franz *et al.*, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2002; Drahovska *et al.*, 2004; Abriouel *et al.*, 2008; Templer *et al.*, 2008; Vankerckhoven *et al.*, 2008). Although antibiotic resistant enterococci have been isolated from foods, only few are resistant to the clinically important antibiotics ampicillin, penicillin, gentamycin, and vancomycin (Franz *et al.*, 2003). In this respect, the fact that all the *E. faecium* strains analyzed in our study were sensitive to these antibiotics of clinical relevance, as well as to teicoplanin and chloramphenicol, and all but 3 strains (*E. faecium* SMF4, *E. faecium* SMF20, and *E. faecium* SMF60) were also sensitive to tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, and rifampicin, is of relevance for their potential use in the food industry.

Concerning the non-enterococcal strains, they represented 28.1% of the 64 LAB isolates with direct antimicrobial activity selected in our study, being *P. pentosaceus* the most abundant species (11%). Strikingly, most *P. pentosaceus* strains (71.4%) were isolated from seabass and none but one showed bacteriocin activity. Similarly, Pinto *et al.* (2009) reported the identification of only a bacteriocinogenic *P. pentosaceus* strain from 78 bacteriocinogenic LAB isolated from non-fermented shellfish. On the contrary, Kopermsub and Yunchalard (2010) isolated 762 LAB strains from a traditional fermented fish product of Thailand, and founded a high prevalence of *P. pentosaceus* and *W. cibaria* at different stages of the fermentation process. With regard to this, *W. cibaria* represented 8% of the 64 LAB isolates with direct antimicrobial activity selected in our study, being all the strains isolated from octopus, but none of them exerted bacteriocin activity. *Lactobacillus* species have been previously isolated from freshwater fish (González *et al.*, 1999; Bucio *et al.*, 2006), smoked salmon (Todorov *et al.*, 2011a), marine oyster (Lee *et al.*, 2010), and they have been also tested as probiotic cultures to protect against the fish pathogen *Lc. garvieae* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011); however, studies regarding their isolation from marine fish are very scarce. In our study, strains of *Lactobacillus* spp. (*Lb. sakei* and *Lb. curvatus*) were isolated from different samples, representing 8% of the 64 selected LAB isolates with direct antimicrobial activity, and all but one displayed bacteriocin activity. It should be noted that most lactobacilli (60%) were isolated from RTE products (cold-smoked and marinated Atlantic salmon, and dry-salted cod), which is in agreement with previous studies (Tomé *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2011a). The genus *Leuconostoc* is associated with fish and fish products, and specifically *Le. mesenteroides* was early isolated from seafood (Mauguin and Nobel, 1994) and fresh

anchovy (Belfiore *et al.*, 2010). In our study, a single strain out of the 64 selected LAB isolates with direct antimicrobial activity was identified as *Le. mesenteroides* (2%), but this strain did not show bacteriocin activity. Moreover, *Carnobacterium* spp. were not found in any of the tested fish samples; however, their presence in the digestive tract of fish has been previously reported (Ringø *et al.*, 2001; Seppola *et al.*, 2006), being *C. maltaromaticum* and, to a lesser extent, *C. divergens* considered as a part of the normal intestinal microbiota of many fish species (Ringø and Gatesoupe, 1998; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000).

In conclusion, our study demonstrates the suitability of fish, seafood and fish products as ecological niches for the isolation of LAB, including (multi)bacteriocinogenic strains, mainly enterococci, encoding previously described or, to a lesser extent, unknown broad antimicrobial spectrum bacteriocins active against *L. monocytogenes* and other food-borne pathogens. Amongst the 25 bacteriocinogenic LAB isolates, the strain *Lb. curvatus* BCS35 stands out because of its broad antimicrobial spectrum and strong inhibitory activity against *L. monocytogenes* and several fish spoilage and pathogenic bacteria, such as *Br. thermosphacta*, *C. piscicola* and *Sh. putrefaciens*, and thus bacteriocin characterization and evaluation of this strain as fish biopreservative constitute tasks of the outmost interest for the food industry.

III.6. REFERENCES

- Abriouel, H., N. B. Omar, A. C. Molinos, R. L. López, M. J. Grande, P. Martínez-Viedma, E. Ortega, M. M. Canamero, and A. Gálvez. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 38–49.
- Almeida, T., A. Brandão, E. Muñoz-Atienza, A. Gonçalves, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. Poeta. 2011. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. *J. Food Prot.* 74: 1252–1260.
- Alves, V. F., E. C. P. de Martinis, M. T. Destro, B. F. Vogel, and L. Gram. 2005. Antilisterial activity of *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. *J. Food Prot.* 68: 2068–2077.
- Apun, K., A. M. Yusof, and K. Jugang. 1999. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ. Health Res.* 9: 285–292.
- Austin, B. 2002. The bacterial microflora of fish. *ScientificWorldJournal* 2: 558–572.
- Austin, B. and D. McIntosh. 1991. New bacterial fish pathogens and their implications for fish farming. *Rev. Med. Microbiol.* 2: 230–236.
- Autio, T., S. Hielm, M. Miettinen, A. M. Sjöberg, K. Aarnisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm, and H. Korkeala. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 150–155.
- Axelsson, L. and A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177: 2125–2137.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. Eijsink, and A. Holck. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 137–143.

- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga, and I. F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676–1682.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Márquez, O. Gironés, and J. K. Muzquiz. 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration on Brown trout (*Salmo trutta*). *Br. J. Nutr.* 87: 522–527.
- Balla, E., L. M. T. Dicks, M. du Toit, M. J. van der Merwe, and W. H. Holzapfel. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1298–1304.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45: 493–496.
- Baya, A. M., A. E. Toranzo, B. Lupiani, T. Li, B. S. Roberson, and F. M. Hetrick. 1991. Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3114–3120.
- Belfiore, C., J. Björkroth, E. Vihavainen, R. Raya, and G. Vignolo. 2010. Characterization of *Leuconostoc* strains isolated from fresh anchovy (*Engraulis anchoita*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56: 175–180.
- Boulares, M., L. Mejri, and M. Hassouna. 2011. Study of the microbial ecology of wild and aquacultured tunisian fresh fish. *J. Food Prot.* 74: 1762–1768.
- Brandão, A., T. Almeida, E. Muñoz-Atienza, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, L. M. Cintas, P. Poeta, and C. Herranz. 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.* 192: 927–936.
- Brett, M. S. Y., P. Short, and J. McLauchlin. 1998. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 223–229.
- Bucio, A., R. Hartemink, J. W. Schrama, J. Verreth, and F. M. Rombouts. 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with recirculation system. *Food Microbiol.* 23: 476–482.
- Cai, Y., P. Suyanandana, P. Saman, and Y. Benno. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Gen Appl. Microbiol.* 45: 177–184.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal, and J. Barros-Velazquez. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1: 43–63.
- Carnevali, O., L. De Vivo, R. Sulpizio, G. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi, and A. Cresci. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258: 430–438.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, and P. E. Hernández. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686–707.
- Chen, H. and D. G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 82–100.
- Chen, C.-M., J. G. Sebranek, J. S. Dickson, and A. F. Mendonca. 2004. Combining pediocin with post-packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *J. Food Prot.* 67: 1866–1875.

- Cintas, L. M.** 1995. Caracterización bioquímica y genética de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Ph.D. Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, and P. E. Hernández.** 2000a. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* 318: 61–70.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 2000b. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281–305.
- Citti, R.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Ph.D Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen, and P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 22–28.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- CLSI.** 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100–S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Coque, T. M., J. E. Patterson, J. M. Steckelberg, and B. E. Murray.** 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregative substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* 171: 1223–1229.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Daeschel, M. A. and H. P. Fleming.** 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1: 303–313.

- Dayem, M. A., Y. Fleury, G. Devilliers, E. Chaboisseau, R. Girard, P. Nicolas, and A. Delfour. 1996. The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 251–259.
- de la Fuente-Salcido, N. M., J. E. Barboza-Corona, A. N. Espino Monzón, R. D. Pacheco Cano, N. Balagurusamy, D. K. Bideshi, and R. Salcedo-Hernández. 2012. Expanding the use of a fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ScientificWorldJournal* 2012: 503269.
- de Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, and W. B. Whitman. 2009. The Firmicutes. In: “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, vol. 3, 2nd edition. Springer, New York, NY, USA.
- de Vuyst, L. and F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier, and Y. Fleury. 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs* 8: 1153–1177.
- Diep, D. B. and I. F. Nes. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Drahovska, H., L. Slobodnikova, D. Kocincova, M. Seman, R. Koncekova, J. Trupl, and J. Turna. 2004. Antibiotic resistance and virulence factors among clinical and food enterococci isolated in Slovakia. *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 763–768.
- Draper, L. A., R. P. Ross, C. Hill, and P. D. Cotter. 2008. Lantibiotic immunity. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 9: 39–49.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen, and H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24–27. *Erratum*, 33: 1434.
- Dyer, F. E. 1947. The microorganisms from Atlantic cod. *J. Fish Res. Board Can.* 7: 128–136.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA. 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, October 2005.
- EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.

- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.
- Eijsink, V. G., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg, and I. F. Nes. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.
- Eijsink, V. G., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Havarstein, H. Holo, and I. F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato, and T. Matsui. 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad, and W. Tham. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2904–2907.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2003–2009. Fisheries Topics: Utilization. Processing fish and fish products. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 2006 15 09. [Cited 8 January 2010]. <http://www.fao.org/fishery/topic/736/en>.
- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Rome, Italy.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization and World Health Organization). 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. FAO and WHO, Rome, Italy.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink, and J. Nissen-Meyer. 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148: 3661–3670.
- Foulquié Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. de Vuyst. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Franz, C. M., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C. M., A. Grube, A. Herrmann, H. Abriouel, J. Starke, A. Lombardi, B. Tauscher, and W. H. Holzapfel. 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2550–2554.
- Franz, C. M., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, and W. H. Holzapfel. 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105–122.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Fraser, O. P. and S. Sumar. 1998. Compositional changes and spoilage in fish (part II)—microbiological induced deterioration. *Nutr. Food Sci.* 98: 325–329.
- Gálvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada, and E. Montoya. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 32: 765–771.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. Ben Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.

- Garriga, M., M. T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort, and M. Hugas.** 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509–518.
- Gatesoupe, F. J.** 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147–165.
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 107–114.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall, and D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
- González, C. J., T. M. López-Díaz, M. L. García-López, M. Prieto, and A. Otero.** 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62: 1270–1277.
- González, C. J., J. P. Encinas, M. L. García-López, and A. Otero.** 2000. Characterisation and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiol.* 17: 383–391.
- Gram, L.** 1992. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 25–39.
- Gram, L. and H. H. Huss.** 1996. Microbial spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–137.
- Gram, L. and P. Dalgaard.** 2002. Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 262–266.
- Gregersen, T.** 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 123–127.
- Hagi, T., D. Tanaka, Y. Iwamura, and T. Hoshino.** 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234: 335–346.
- Hammes, W. P. and C. Hertel.** 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: “*The Prokaryotes*” Vol. 4, pp. 320–403. Dworkin, M. (ed.). Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan, and D. van Sinderen.** 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108: 169–177.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross, and C. Hill.** 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149: 655–664.
- Hiu, S. F., R. A. Holt, N. Sriranganathan, R. J. Seidler, and J. L. Fryer.** 1984. *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 393–400.
- Hunt, C. P.** 1998. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br. J. Biomed. Sci.* 55:149–156.
- Huss, H. H.** 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 348.
- Huss, H. H., L. V. Jørgensen, and B. F. Vogel.** 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 267–274.
- Hühne, K., L. Axelsson, A. Holck, and L. Kröckel.** 1996. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology* 142: 1437–1448.
- Itoi, S., T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, Y. Kanomata, and H. Sugita.** 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 116–121.

- Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas, and J. Nissen-Meyer.** 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2647–2652.
- Jørgensen, L. V. and H. H. Huss.** 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 127–131.
- Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Coulette, and M. G. Bergeron.** 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3497–3503.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–85.
- Klare, I., C. Konstabel, D. Badstubner, G. Werner, and W. Witte.** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 269–290.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103–125.
- Kopermsub, P. and S. Yunchalard.** 2010. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of *plaa-som*, a traditional fermented fish product of Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 200–204.
- Korkeala, H., T. Alanko, and T. Tiusanen.** 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta. Vet. Scand.* 33: 27–32.
- Kraus, H.** 1961. Mitteilung über das Vorkommen von Lactobazillen auf frischen Heringen. *Arch. Lebensmittelhyg.* 12: 101–102.
- Kullen, M. K., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell, and T. R. Klaenhammer.** 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89: 511–516.
- Kvasnikov, E. I., N. K. Kovalenko, and L. G. Materinskaya.** 1977. Lactic acid bacteria of freshwater fish. *Mikrobiologiya* 46: 619–624.
- Lee, H. I., M. H. Kim, K. Y. Kim, and J. S. So.** 2010. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostres gigas*). *Anaerobe* 16: 522–526.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Leisner, L., J. C. Milan, H. H. Huss, and L. M. Larsen.** 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugar-salted fish. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 417–423.
- Liston, J.** 1980. Microbiology in fishery science. In: “*Advances in fishery science and technology*”, pp. 138–157. Connell, J. J. (ed.). Fishing News Books Ltd., Farnham, England, UK.
- Leroi, F.** 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27: 698–709.
- Leroi, F., N. Arbey, J. Joffraud, and F. Chevalier.** 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending shelf-life of vacuum-packed cold-smoked salmon. *Int. J. Sci. Technol.* 31: 497–504.
- Line, J. E., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, B. S. Seal, G. R. Siragusa, and N. J. Stern.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1094–1100.
- Liu, J. Y., A. H. Li, C. Ji, and W. M. Yang.** 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet. Microbiol.* 136: 314–320.

- Loncarevic, S., W. Tham, and M. L. Danielsson-Tham.** 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in smoked and 'gravad' fish. *Acta Vet. Scand.* 37: 13–18.
- Lyhs, U.** 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Ph.D. Thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Martín, M.** 2006. Identificación y evaluación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas y detección de factores potenciales de virulencia de enterococos aislados de palomas torcaces (*Columba palumbus*). Caracterización bioquímica y genética de la columbicina A de *Enterococcus columbae* PLCH2 y construcción de quimeras génicas que permiten la producción y expresión funcional de la enterocina A y la pediocina PA-1 y su co-producción con la nisina A en cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Ph.D Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Mauguin, S. and G. Novel.** 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *J. Appl. Microbiol.* 76: 616–625.
- Messaoudi, S., G. Kergourlay, M. Dalgalarrrondo, Y. Choiset, M. Ferchichi, H. Prévost, M. F. Pilet, J. M. Chobert, M. Manai, and X. Dousset.** 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* 32: 129–134.
- Michel, C., C. Pelletier, M. Boussaha, D. G. Douet, A. Lautraite, and P. Tallez.** 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2947–2955.
- Miettinen, M. K., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. J. Bjorkroth, and H. J. Korkeala.** 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2358–2360.
- Moreira, W. L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Morrison, D., N. Woodford, and B. Cookon.** 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol.* 83: 89S–99S.
- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faid, and A. Bouseta.** 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 295–310.
- Nes, I. F. and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55: 50–61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge, and J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action and applications*”, pp. 81–115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur, and R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Nilsen, T., I. F. Nes, and H. Holo.** 2003. Enterolysin A, a cell-wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2975–2984.
- Nilsson, L., L. Gram, and H. H. Huss.** 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62: 336–342.

- Nilsson, L., T. B. Hansen, P. Garrido, C. Buchrieser, P. Glaser, S. Knøchel, L. Gram, and A. Gravesen. 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 172–183.
- Núñez, M., J. L. Rodríguez, E. García, P. Gaya, and M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671–677.
- Ogier, J. C. and P. Serror. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291–301.
- Ogier, J. C., E. Casalta, C. Farrokh, and A. Saihi. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286–290.
- Østergaard, A., P. K. B. Embarek, C. Wedell-Neergaard, H. H. Huss, and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiol.* 15: 223–233.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield, and I. Ruiz-Zarzuela. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 34: 499–507.
- Petersen, A. and A. Dalsgaard. 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ. Microbiol.* 5: 395–402.
- Pfeiler, E. A. and T. R. Klaenhammer. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends. Microbiol.* 15: 546–553.
- Pinto, A. L., M. Fernandes, C. Pinto, H. Albano, F. Castilho, P. Teixeira, and P. A. Gibbs. 2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 50–58.
- Poeta, P., D. Costa, B. Rojo-Bezares, M. Zarazaga, N. Klibi, J. Rodrigues, and C. Torres. 2007. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol. Res.* 162: 257–263.
- Poyart, C., G. Quesnes, and P. Trieu-Cuot. 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 415–418.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terbiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177: 1144–1151.
- Quadri, L. E. N., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcription regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163–6171.
- Richards, G. P., M. A. Watson, E. J. Cran 3rd, I. G. Burt, and D. Bushek. 2008. *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in oysters and seawater from the Delaware Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3323–3327.
- Ringø, E. 2004. Lactic acid bacteria in fish and fish farming. In: “*Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*”, pp. 581–610. Salminen, S., A. Ouwehand, and A. von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.
- Ringø, E. 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquac. Res.* 39: 171–180.
- Ringø, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177–203.

- Ringø, E., H. R. Bendiksen, M. S. Wesmajervi, R. E. Olsen, P. A. Jansen, and H. Mikkelsen. 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *J. Appl. Microbiol.* 89: 317–322.
- Ringø, E., M. S. Wesmajervi, H. R. Bendiksen, A. Berg, R. E. Olsen, T. Johnsen, H. Mikkelsen, M. Seppola, E. Strøm, and W. Holzapfel. 2001. Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 183–191.
- Ringø, E., U. Schillinger, and W. Holzapfel. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: “*Microbial Ecology in Growing Animals*”, pp. 418–453. Holzapfel, W. H., P. J. Naughton, S. G. Pierzynowski, R. Zabielski, and E. Salek (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, UK.
- Rocourt, J., C. Jacquet, and A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 197–209.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney, and C. Hill. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337–346.
- Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Ross, R. P., P. Sporns, H. M. Dodd, M. J. Gasson, F. A. Mellon, and L. M. McMullen. 2003. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3174–3178.
- Rørvik, L. M. 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 183–190.
- Sánchez, J. 2008. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. Ph.D Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernandez. 2007a. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227–236.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117: 295–305.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernandez. 2008. Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2471–2479.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
- Semedo, T., M. Almeida Santos, P. Martins, M. F. Silva Lopes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2569–2576.
- Seppola, M., R. E. Olsen, E. Sandaker, P. Kanapathipillai, W. Holzapfel, and E. Ringø. 2006. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 131–137.
- Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas, and M. Gilmore. 2004. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 609–618.

- Shewan, J. M.** 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: “*Recent advances in food science*”, pp. 167–193. Hawthorn, J. and J. Muil Leitch (eds.). Butterworths, London, UK.
- Shewan, J. M.** 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: “*Proceedings of the conference on handling, processing and marketing of tropical fish*”, pp. 51–66. Tropical Products Institute, London, UK.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1–29.
- Svetoch, E. A., B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. N. Borzenkov, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, Y. N. Kovalev, Y. G. Stepanshin, G. R. Siragusa, B. S. Seal, and N. J. Stern.** 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1942–1948.
- Svetoch, E. A., B. V. Eruslanov, V. P. Levchuk, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, J. Stepanshin, I. Dyatlov, B. S. Seal, and N. J. Stern.** 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2749–2754.
- Swe, P. M., N. C. K. Heng, Y.-T. Ting, H. J. Baird, A. Carne, A. Tauch, J. R. Tagg, and R. W. Jack.** 2007. *efl1097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 153: 3218–3227.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Benech, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet, and I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.
- Templer, S. P., P. Rohner, and A. Baumgartner.** 2008. Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from foods and clinical specimens. *J. Food Prot.* 71: 2100–2104.
- Tham, W., H. Ericsson, S. Loncarevic, H. Unnerstad, and M. L. Danielsson-Tham.** 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 173–175.
- Todorov, S. D., C. Rachman, A. Fourrier, L. M. Dicks, C. A. van Reenen, H. Prévost, and X. Dousset.** 2011a. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* 17: 23–31.
- Todorov, S. D., D. N. Furtado, S. M. Saad, E. Tomé, and B. D. Franco.** 2011b. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 110: 971–986.
- Tomé, E., S. D. Todorov, P. A. Gibbs, and P. C. Teixeira, P.** 2009. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* 23: 50–73.
- Toranzo, A. E., B. Novoa, J. L. Romalde, S. Núñez, S. Devesa, E. Marino, R. Silva, E. Martínez, A. Figueras, and J. L. Barja.** 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from 3 farms in Northwest Spain. *Aquaculture* 114: 189–202.
- Truelstrup Hansen, L., T. Gill, and H. H. Huss.** 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold smoked salmon. *Food Res. Int.* 28: 101–103.
- Uhart, M., S. Ravishankar, and N. D. Maks.** 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4°C. *J. Food Prot.* 67: 2296–2301.

- Valenzuela, A. S., N. Benomar, H. Abriouel, M. M. Cañamero, and A. Gálvez.** 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* 27: 955–961.
- Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Bjorkroth, C. M. Franz, M. R. Foulquié Moreno, H. Revets, L. de Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio, and W. H. Holzapfel.** 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1381–1391.
- Vankerckhoven, V., G. Huys, M. Vancanneyt, C. Snauwaert, J. Swings, I. Klare, W. Witte, T. Van Autgaerden, S. Chapelle, C. Lammens, and H. Goossens.** 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4247–4255.
- Venema, K., J. Kok, J. D. Marugg, M. Y. Toonen, A. M. Ledeboer, G. Venema, and L. M. Chikindas.** 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17: 515–522.
- Witte, W., R. Wirth, and I. Klare.** 1999. Enterococci. *Chemotherapy* 45: 135–145.
- Xu, X., D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F. Wang, G. A. Jacoby, and M. Wang.** 2010. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4643–4647.
- Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue, and T. J. Montville.** 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66: 1420–1425.

SUPLEMENTO DE DATOS / *SUPPLEMENTAL DATA*

Table III.5. Antimicrobial activity of 197 LAB strains isolated from fish, seafood and fish products against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria^a.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms ^b																			
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>E. faecium</i>			<i>P. acidilactici</i>	<i>B. thermosphacta</i>		<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>			
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378
Squid																				
CV1	10.3 s-	13.4 s-	13.3 s	Nizd	Nizd	17.2 s	3.0 d	3.0 d	14.1 d	7.2 s	15.4 s	12.9 s2	20.7 s	9.0 s-	7.0 s2	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nizd
CV2	11.4 s-	15.0 s-	14.7 s	Nizd	Nizd	17.6 s	3.0 d	3.0 d	10.3 d	7.2 s	16.6 s	5.7 s-	8.7 s	8.1 s-	9.3 s2	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nizd
Rainbow trout																				
TPP2	12.3 s+	13.9 s+	12.6 s+	5.8 s	14.4 s	Nd	4.0 d	Nizd	11.6 s+	5.7 s2	12.3 d	Nizd	8.0 s2	8.4 s2	8.0 s2	10.2 s-	6.6 s	Nd	Nd	Nizd
TPP3	9.8 s+	8.7 s+	Nd	10.0 s	17.2 s	Nd	8.3 d	7.8 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	10.5 s-	Nd	Nd	Nizd
TPM74	10.1 s	8.2 s	Nd	3.9 d	10.8 d	Nd	5.5 d	Nizd	11.1 s+	4.8 s	12.9 d	Nizd	8.6 s2	8.8 s	3.9 s	Nizd	11.3 s	Nd	Nd	Nizd
TPM76	15.9 s	9.1 s	Nd	6.7 d	17.5 d	Nd	11.0 s	6.3 d	15.4 s+	6.5 s2	13.9 d	Nizd	9.1 s2	11.7 s	7.8 s2	12.1 s-	Nizd	Nd	Nd	Nizd
Bass																				
LPP29	Nizd	Nizd	Nizd	10.6 s2	4.5 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
LP132	6.7 s	5.3 s	7.9 s	7.4 s	8.6 s	7.6 s	5.5 s	5.2 s	5.6 s	4.5 s	6.8 s	5.8 s	5.2 s	3.0 d	3.0 d	Nd	Nd	5.8 s	Nd	7.8 s
LP137	6.4 s	5.6 s	8.1 s	9.2 s	9.6 s	5.8 s	4.4 s	6.0 s	4.5 s	4.5 s	7.8 s	5.1 s	5.0 s	3.0 d	3.0 d	Nd	Nd	6.2 s	Nd	6.6 s
LPV46	6.5 s	5.7 s	8.8 s	11.9 s	11.6 s	7.1 s	6.1 s	6.5 s	6.1 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	6.9 s	Nd	6.9 s
LPV57	Nizd	6.2 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	5.8 s2	Nd	Nizd
LPM78	6.9 s	5.7 s	5.1 s	7.9 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	6.3 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	3.0 d	Nd	Nd	5.3 s	Nd	7.2 s
LPM83	Nizd	Nizd	Nizd	7.2 s	5.8 s	3.0 d	Nizd	5.3 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
Cockle																				
B5	10.7 s	Nd	9.2 s	9.6 s-	Nd	17.3 s	8.4 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B6	7.9 s	Nd	7.7 s-	7.8 s-	Nd	18.6 s	7.7 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B7	9.1 s	Nd	5.7 s-	7.2 s-	Nd	15.2 s	7.9 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B11	7.3 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	6.8 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	11.4 s
B12	6.5 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	10.3 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B13	6.2 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	12.5 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B14	7.4 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	10.6 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B21	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	4.8 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B26	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	Nd	5.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B27	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	5.4 s	8.1 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B41	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	Nd	9.7 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B42	7.4 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	5.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B43	7.5 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	6.4 s	8.3 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B44	7.6 s	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	5.9 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B46	7.0 s	Nd	Nizd	Nizd	Nd	6.4 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd
B53	7.4 s	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nizd

Table III.5. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms																			
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Lactobacillus</i> spp.			<i>E. faecium</i>		<i>P. acidilactici</i>	<i>B. thermosphacta</i>	<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>			
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378
Octopus																				
P18	3.0 d	Nd	Nizd	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	5.1 s	Nd	3.0 d
P19	3.0 d	Nd	4.6 s	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.8 s	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P36	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	6.0 s	3.7 s	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	4.4 s	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	Nizd
P38	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	4.5 s	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	5.4 s	Nd	Nizd	5.3 s	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P43	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	5.5 s	Nizd	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P50	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	7.1 s	5.3 s	3.0 d	Nizd	Nd	Nd	Nizd	5.0 s	Nd	Nizd	Nizd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P61	5.6 s	Nd	5.9 s	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	7.2 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	5.9 s	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P62	5.9 s	Nd	6.1 s	3.0 d	Nd	3.0 d	6.1 s	6.4 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	5.5 s	Nd	Nizd	5.4 s	6.0 s	3.0 d	Nd	3.0 d
P63	4.8 s	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	5.9 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	5.1 s	Nd	3.0 d
P64	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	5.9 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	5.0 s	Nd	3.0 d
P65	6.3 s	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	6.5 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P66	6.1 s	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	6.7 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P67	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	6.1 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P68	6.1 s	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	7.6 s	6.1 s	Nizd	Nd	Nd	Nizd	5.7 s	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P69	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	4.9 s	3.0 d	Nd	9.1 s-	Nizd	5.1 s	Nd	6.01 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d
P70	5.9 s	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	Nizd	5.2 s	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d
P71	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	6.3 s2	10.1 s	Nd	7.2 s	Nizd	6.7 s	Nd	7.98 s+	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P72	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	6.9 s2	8.3 s	Nd	11.4 s-	Nizd	6.5 s	Nd	7.93 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P73	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	3.8 s	Nizd	Nd	11.5 s-	Nizd	7.4 s	Nd	Nizd	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P74	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	7.2 s2	7.8 s	Nd	9.4 s-	Nizd	7.4 s	Nd	7.75 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P75	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	6.0 s2	8.9 s2	Nd	11.1 s	Nizd	5.7 s	Nd	7.18 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P76	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	7.0 s2	8.3 s	6.5 s-	11.7 s	Nizd	6.4 s	Nd	7.79 s+	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P77	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	7.1 s2	9.4 s	9.1 s-	11.2 s-	Nizd	6.1 s	Nd	7.74 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
P78	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	6.2 s2	9.5 s	7.3 s-	11.1 s-	Nizd	6.2 s	Nd	7.93 s	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d
Sardine																				
SDP2	Nd	Nd	5.0 s-	Nd	Nd	Nd	6.9 s2	7.7 s2	Nd	3.9 s-	5.4 s2	4.8 s2	4.0 s2	3.0 d	Nizd	4.6 s-	4.3 s	Nd	3.0 d	4.2 s
SDP7	Nd	Nd	5.2 s-	Nd	Nd	Nd	6.0 s2	6.8 s2	Nd	4.1 s-	4.6 s2	5.1 s2	4.1 s2	3.0 d	3.0 d	6.2 s-	4.2 s	Nd	3.0 d	4.9 s
SDP10	Nd	Nd	6.1 s-	Nd	Nd	Nd	6.6 s2	7.2 s2	Nd	4.9 s-	5.6 s2	4.7 s2	3.2 s	3.0 d	3.0 d	4.5 s-	4.6 s	Nd	3.0 d	5.2 s
SDM31	Nd	Nd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	3.7 s-	3.5 s2	5.4 s-	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd
SDM36	Nd	Nd	6.0 s-	Nd	Nd	Nd	3.0 d	3.0 d	Nd	4.5 s-	3.0 d	5.3 s-	3.0 d	3.0 d	Nizd	4.1 s-	3.0 d	3.0 d	5.3 d	3.0 d
SDM37	Nd	Nd	6.9 s-	Nd	Nd	Nd	7.6 s2	6.9 s2	Nd	4.6 s-	4.6 s	5.6 s-	4.0 s	3.0 d	3.0 d	4.7 s-	3.8 s-	Nd	3.0 d	4.3 s
SDM38	Nd	Nd	4.5 s-	Nd	Nd	Nd	3.0 d	5.5 s	Nd	3.7 s-	3.0 d	4.1 s-	3.0 d	3.0 d	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	3.0 d	3.0 d
SDV75	Nd	Nd	6.3 s-	Nd	Nd	Nd	5.9 s	7.1 s	Nd	4.6 s-	4.4 s	4.4 s	3.0 d	3.0 d	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nd	3.0 d	3.0 d
SDV84	Nd	Nd	3.0 d	Nd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	4.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd

Table III.5. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms																				
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.			<i>Lactobacillus</i> spp.			<i>E. faecium</i>			<i>P. acidilactici</i>	<i>B. thermosphacta</i>		<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>	
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378	
Cold-smoked Atlantic salmon																					
SMA1	3.8 s-	Nd	8.3 s	Nizd	Nd	3.0 d	5.1 s	4.4 s	Nd	9.2 s2	11.1 s	Nizd	6.9 s	9.0 s	6.1 s2	3.0 s-	11.5 s	Nd	9.5 s	3.0 d	
SMA2	2.6 s-	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	10.4 s2	9.0 s	6.2 s	Nizd	Nizd	2.0 s-	3.0 d	Nd	Nizd	3.0 d	
SMA3	3.4 s-	Nd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.6 s2	8.8 s	6.7 s	Nizd	Nizd	3.9 s-	3.0 d	Nd	Nizd	4.2 s-	
SMA4	2.8 s-	Nd	8.8 s	6.7 s-	Nd	3.0 d	3.8 s	4.5 s	Nd	9.5 s2	11.7 s	Nizd	7.5 s	8.1 s	7.8 s2	3.5 s-	11.4 s	Nd	9.1 s	3.0 d	
SMA5	3.4 s-	Nd	9.7 s	5.0 s-	Nd	3.0 d	4.5 s	4.2 s	Nd	10.5 s2	12.0 s	Nizd	7.6 s	8.3 s	8.3 s2	2.3 s-	10.4 s	Nd	9.6 s	3.0 d	
SMA6	3.0 s-	Nd	7.8 s	Nizd	Nd	3.0 d	5.3 s	4.6 s	Nd	10.5 s2	12.3 s	Nizd	7.2 s	8.5 s	7.6 s2	3.3 s-	11.3 s	Nd	10.1 s	3.0 d	
SMA7	3.4 s-	Nd	9.1 s	Nizd	Nd	3.0 d	5.5 s	5.1 s	Nd	9.5 s2	12.3 s	Nizd	7.1 s	8.3 s	7.1 s2	2.8 s-	12.2 s	Nd	8.4 s	3.0 d	
SMA8	2.8 s-	Nd	7.8 s	6.8 s-	Nd	3.0 d	3.9 s	5.5 s	Nd	9.6 s2	11.3 s	Nizd	8.0 s	7.3 s	8.3 s2	2.1 s-	11.2 s	Nd	9.8 s	3.0 d	
SMA9	2.5 s-	Nd	10.4 s	6.1 s-	Nd	3.0 d	4.6 s	4.4 s	Nd	8.9 s2	12.7 s	Nizd	6.6 s	8.0 s	5.6 s2	2.1 s-	11.1 s	Nd	8.9 s	3.0 d	
SMA10	3.0 s-	Nd	13.3 s	5.9 s-	Nd	3.0 d	5.2 s	4.2 s	Nd	10.2 s2	11.3 s	Nizd	7.8 s	8.5 s	7.1 s2	3.1 s-	9.9 s	Nd	8.4 s	3.0 d	
SMA11	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.6 s	5.3 s-	5.2 s	Nizd	Nizd	Nizd	4.8 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA14	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	6.9 d	Nd	Nizd	9.5 s	5.6 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	5.3 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA15	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	8.4 s	5.0 s-	4.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	5.2 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA16	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	8.5 s	6.3 s-	4.9 s	Nizd	Nizd	Nizd	4.8 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA17	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.1 s	5.8 s-	4.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	6.4 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA18	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.7 s	5.9 s-	4.3 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMA19	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.2 s	4.6 s-	4.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	
SMA20	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	8.9 s	4.4 s-	5.9 s	Nizd	Nizd	Nizd	6.2 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA21	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	8.8 s	3.9 s-	4.3 s	Nizd	Nizd	Nizd	4.8 s	Nd	Nizd	Nizd	
SMA22	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.2 s	6.1 s-	4.5 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	
SMA23	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	7.8 s	3.5 s-	4.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	
SMA24	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	9.2 s	5.0 s-	5.0 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nd	Nizd	Nizd	
SMA25	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	4.4 s-	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	4.9 s	Nd	3.9 s-	Nizd	
SMA33	Nizd	Nd	8.5 s	Nizd	Nd	Nizd	5.4 s	Nizd	Nd	9.7 s2	11.9 s	Nizd	7.4 s	8.2 s	6.3 s2	3.0 d	10.5 s	Nd	7.8 s	3.0 d	
SMA35	Nizd	Nd	9.4 s	5.1 s-	Nd	Nizd	4.5 s	Nizd	Nd	9.7 s2	11.3 s	Nizd	5.9 s	7.2 s	8.6 s2	3.0 d	8.3 s	Nd	8.3 s	3.0 d	
SMA36	Nizd	Nd	9.9 s	5.2 s-	Nd	Nizd	6.4 s	Nizd	Nd	10.1 s2	12.0 s	Nizd	7.5 s	8.5 s	8.8 s2	3.0 d	11.7 s	Nd	8.4 s	Nizd	
SMA38	Nizd	Nd	10.4 s	Nizd	Nd	Nizd	5.5 s	Nizd	Nd	10.1 s2	12.6 s	Nizd	7.0 s	8.4 s	8.4 s2	3.0 d	11.0 s	Nd	7.9 s	3.0 d	
SMA39	Nizd	Nd	10.6 s	Nizd	Nd	Nizd	5.7 s	Nizd	Nd	10.0 s2	12.5 s	Nizd	6.5 s	7.4 s	8.2 s2	3.0 d	10.1 s	Nd	7.7 s	3.0 d	
SMA40	Nizd	Nd	9.4 s	Nizd	Nd	Nizd	6.0 s	Nizd	Nd	9.7 s2	10.7 s	Nizd	5.3 s	7.8 s	7.6 s2	3.0 d	12.4 s	Nd	9.1 s	3.0 d	
Albacore																					
BNM55	9.9 s	14.4 s	Nd	11.0 s	12.7 s	Nizd	4.8 s-	5.8 s-	11.4 s	7.4 s2	11.9 s	3.0 d	8.5 s	9.4 s	7.4 s2	12.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM56	9.9 s	11.8 s	Nd	11.2 s	13.6 s	Nizd	3.7 s-	6.9 s-	12.3 s	8.1 s2	11.6 s	3.0 d	9.1 s	9.2 s	6.7 s2	12.0 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM57	10.9 s	11.8 s	Nd	12.0 s	13.3 s	Nizd	3.6 s-	5.9 s-	10.1 s	8.1 s2	11.7 s	3.0 d	9.0 s	9.1 s	6.6 s2	14.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM58	11.2 s	12.6 s	Nd	13.2 s	12.2 s	Nizd	6.2 s-	7.0 s-	11.4 s	8.5 s2	13.7 s	3.0 d	9.1 s	10.3 s	10.0 s2	14.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM60	11.5 s	12.6 s	Nd	14.3 s	13.3 s	Nizd	6.5 s-	7.2 s-	13.2 s	8.0 s2	13.1 s	3.0 d	8.3 s	10.0 s	9.3 s2	14.5 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM69	10.3 s	13.7 s	Nd	12.6 s	13.7 s	Nizd	5.2 s-	5.8 s-	11.6 s	7.4 s2	12.7 s	3.0 d	7.9 s	8.8 s	8.0 s2	13.3 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	
BNM70	10.7 s	11.7 s	Nd	12.5 s	13.3 s	Nizd	5.7 s-	5.9 s-	9.6 s	7.7 s2	11.7 s	3.0 d	8.1 s	9.7 s	7.7 s2	14.1 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	

Table III.5. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms																			
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Carnobacterium</i> spp.			<i>Lactobacillus</i> spp.			<i>E. faecium</i>			<i>P. acidilactici</i>	<i>B. thermosphacta</i>	<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>			
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378
Fresh Atlantic salmon																				
SME1	Nizd	Nizd	Nizd	6.7 s-	7.7 s-	3.0 d	3.9 s-	5.4 d	Nizd	3.7 s-	3.0 d	3.0 d	Nizd	3.0 d	Nizd	7.6 d	Nizd	Nd	Nd	5.0 d
SME2	10.4 s	10.8 s	8.6 s2	7.4 s-	10.0 s-	3.0 d	5.7 s-	3.0 d	Nizd	7.2 s-	9.6 s	8.9 s	9.0 s	3.0 d	Nizd	8.7 d	8.9 s	Nd	Nd	9.3 s
SME3	9.7 s	11.0 s	9.5 s2	8.9 s-	10.1 s-	3.0 d	3.9 s-	3.0 d	Nizd	8.0 s-	10.1 s	8.5 s	6.5 s	3.0 d	Nizd	11.9 d	9.8 s	Nd	Nd	11.2 s2
SME4	10.6 s	10.5 s	9.4 s2	8.5 s-	9.8 s-	3.0 d	7.1 s-	5.5 d	Nizd	7.7 s-	10.4 s2	9.4 s	9.0 s	Nizd	Nizd	12.0 d	10.8 s	Nd	Nd	11.5 s2
SME5	9.5 s	10.4 s	10.3 s2	9.2 s-	8.6 s-	3.0 d	Nizd	4.7 d	Nizd	7.4 s-	9.6 s	9.7 s	10.2 s	Nizd	Nizd	11.8 d	10.1 s	Nd	Nd	9.7 s2
SME7	9.7 s	9.7 s	11.7 s2	9.9 s-	10.5 s-	3.0 d	4.4 s-	5.1 d	Nizd	8.0 s-	11.0 s	9.3 s	8.8 s	Nizd	Nizd	12.1 d	12.0 s	Nd	Nd	7.9 s
SME8	10.4 s	10.7 s	10.9 s2	11.6 s-	13.0 s-	3.0 d	3.0 d	3.0 d	9.6 s2	6.5 s-	11.9 s	3.0 d	10.2 s	10.9 s	7.6 s2	13.8 d	10.5 s-	Nd	Nd	3.0 d
SME9	10.6 s	8.9 s	11.6 s2	10.8 s-	13.4 s-	3.0 d	3.0 d	3.0 d	10.5 s2	6.4 s-	12.12 s	3.0 d	10.5 s	8.6 s	7.0 s2	14.4 d	9.7 d	Nd	Nd	3.0 d
SME10	7.0 s	8.6 s	7.7 s2	9.4 s	9.5 s-	3.0 d	6.8 s	7.4 s-	7.8 s	11.8 s-	14.7 s2	3.0 d	Nizd	3.0 d	7.4 s2	9.6 s2	10.4 s	Nd	Nd	8.9 s2
SME15	9.0 s	9.8 s	10.5 s2	8.5 s-	11.1 s-	3.0 d	4.5 s-	4.2 d	Nizd	7.2 s-	9.6 s	9.5 s	10.5 s	3.9 s-	Nizd	12.2 d	9.2 s-	Nd	Nd	10.3 s2
SME16	3.0 d	3.0 d	5.1 s	6.4 s-	8.7 s-	3.0 d	4.9 s-	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	3.8 s-	Nizd	6.2 d	7.9 s-	Nd	Nd	3.0 d
SME19	8.6 s	8.4 s	9.8 s2	9.5 s-	9.7 s	3.0 d	6.5 s-	4.7 d	6.6 s	12.1 s	14.6 s2	7.4 s	8.9 s	Nizd	Nizd	11.7 s2	9.9 s	Nd	Nd	10.2 s2
SME20	8.3 s	9.7 s	7.7 s2	6.7 s-	7.6 s-	3.0 d	4.6 s-	3.0 d	Nizd	8.6 s-	11.2 s	9.6 s	7.5 s	Nizd	Nizd	8.1 d	11.2 s	Nd	Nd	11.3 s2
SME26	Nizd	Nizd	Nizd	6.6 s-	5.8 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	6.0 s-	6.2 s	Nizd	Nizd	Nizd	6.2 s2	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nizd
SME28	Nizd	Nizd	4.6 s	5.4 s-	6.7 s-	3.0 d	3.8 s-	3.0 d	Nizd	Nizd	3.6 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	7.3 s-	Nd	Nd	4.0 d
SME29	Nizd	Nizd	4.1 s	4.2 s-	7.0 s-	3.0 d	3.6 s-	3.0 d	Nizd	Nizd	8.2 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	5.4 d	3.0 d	Nd	Nd	3.0 d
SME37	7.6 s	7.6 s	9.0 s2	9.9 s	10.0 s	3.0 d	6.5 s	5.5 d	9.9 s	11.6 s	15.1 s2	7.1 s	8.9 s	6.5 s	8.9 s2	12.2 s2	9.2 s-	Nd	Nd	11.0 s2
SME39	10.0 s	9.9 s	10.5 s2	12.6 s-	12.8 s-	3.0 d	3.3 s-	3.0 d	10.1 s2	5.8 s	12.3 s	3.0 d	10.7 s	10.4 s	7.9 s2	11.8 d	8.9 s-	Nd	Nd	3.0 d
SME40	9.4 s	Nd	11.3 s2	11.6 s-	13.3 s-	3.0 d	3.6 s-	Nizd	9.8 s2	5.3 s	9.8 s	3.0 d	10.9 s	10.9 s	6.3 s2	12.0 d	8.2 s-	Nd	Nd	3.0 d
SME41	10.8 s	10.5 s	10.4 s2	12.2 s-	12.6 s-	3.0 d	3.0 d	3.0 d	9.3 s2	5.8 s	11.6 s	3.0 d	11.6 s	10.5 s	7.1 s2	12.6 d	6.2 d	Nd	Nd	3.0 d
SME42	9.6 s	9.9 s	10.0 s2	11.1 s-	11.9 s-	3.0 d	3.0 d	3.0 d	8.2 s2	6.0 s	12.3 s	3.0 d	10.5 s	9.8 s	7.4 s2	11.8 d	7.3 d	Nd	Nd	3.0 d
SME43	9.2 s	10.3 s	10.3 s2	11.7 s-	12.1 s-	3.0 d	3.0 d	3.0 d	9.5 s2	6.4 s	10.9 s	4.3 s	11.3 s	10.5 s	7.0 s2	11.3 d	7.7 d	Nd	Nd	3.0 d
SME54	10.3 s	9.9 s2	10.7 s2	Nd	9.7 s	3.0 d	8.2 s2	9.5 s	13.0 s	15.2 s2	16.9 s2	11.5 s2	12.8 s2	12.3 s2	9.7 s2	15.6 s2	13.8 s	Nizd	Nd	12.6 s
SME55	10.5 s	10.9 s2	11.4 s2	Nd	13.8 s	3.0 d	8.1 s2	9.7 s	Nd	15.2 s2	17.3 s2	12.4 s2	13.0 s2	11.0 s2	11.1 s2	15.1 s2	12.8 s	Nizd	Nd	13.8 s
SME57	9.1 s	9.6 s2	9.7 s2	Nd	13.0 s	3.0 d	8.5 s2	9.2 s	Nd	16.7 s2	17.9 s2	12.5 s2	12.1 s2	10.0 s2	9.9 s2	15.7 s2	12.5 s	Nizd	Nd	12.5 s
SME60	10.6 s	12.5 s2	12.2 s2	Nd	12.8 s	3.0 d	7.8 s2	Nizd	Nd	10.4 s2	12.9 s2	10.3 s	11.0 s2	Nizd	Nizd	13.7 s	11.9 s	Nizd	Nd	12.7 s2
SME69	9.2 s	10.3 s2	10.1 s2	14.6 s	12.9 s	3.0 d	10.9 s2	10.5 s	14.4 s	12.7 s2	16.6 s2	12.0 s2	12.8 s2	11.9 s2	12.7 s2	14.6 s2	13.7 s	Nizd	Nd	14.0 s
SME70	10.2 s	9.9 s2	10.9 s2	12.8 s	12.9 s	3.0 d	10.3 s2	10.4 s	14.2 s	14.3 s2	17.3 s2	12.1 s2	13.6 s2	12.0 s2	13.0 s2	14.4 s2	12.2 s	Nizd	Nd	12.8 s
SME78	10.8 s	10.1 s2	9.7 s2	14.4 s	13.1 s	3.0 d	10.5 s2	10.5 s	18.4 s	14.3 s2	17.9 s2	10.1 s2	10.8 s2	9.4 s2	13.7 s2	15.0 s2	12.2 s	Nizd	Nd	12.7 s
SME100	9.6 s	10.0 s2	10.1 s2	14.7 s	13.2 s	3.0 d	10.3 s2	10.4 s	14.2 s	12.3 s2	16.2 s2	12.7 s2	12.0 s2	13.1 s2	14.2 s2	14.8 s2	13.3 s	Nizd	Nd	11.2 s
Norway lobster																				
CGM13	10.9 s	11.2 s	10.0 s	12.0 s2	11.6 s	4.4 d	5.9 s	5.8 s-	7.7 s	8.8 s2	16.3 s2	6.5 s	9.2 s2	7.0 s2	10.5 s2	11.7 s2	9.6 s-	Nd	Nd	9.0 s-
CGN15	6.3 s	5.7 s	6.0 s	12.9 s2	11.0 s	4.7 d	Nizd	4.6 s-	7.4 s	8.2 s2	16.1 s2	8.1 s2	7.1 s2	7.5 s2	10.1 s2	10.8 s2	7.4 s-	Nd	Nd	6.9 s-
CGM16	10.2 s	9.6 s	11.4 s	12.6 s2	11.5 s	4.4 d	6.1 s	4.6 s-	7.3 s	8.2 s2	15.0 s2	5.8 s	7.3 s2	7.0 s2	10.6 s2	12.5 s2	12.9 s-	Nd	Nd	10.9 s-
CGM17	10.1 s	12.1 s2	12.0 s2	12.0 s	12.2 s-	4.0 d	3.8 s-	4.2 d	5.0 s-	4.5 s-	14.4 s2	4.7 s-	10.0 s2	10.7 s	7.7 s	10.8 s	14.0 s	Nd	Nd	9.2 s-
CGV67	11.2 s	Nd	Nd	Nizd	Nizd	4.9 d	10.3 s2	6.5 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	17.5 s	13.5 d	Nd	Nd	Nizd

Table III.5. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms																				
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>E. faecium</i>				<i>P. acidilactici</i>		<i>B. thermosphacta</i>		<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>		
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323		5194	378
Marinated Atlantic salmon																					
SMM45	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	8.2 s	6.0 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	
SMM46	Nizd	Nd	Nizd	6.9 s-	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	
SMM49	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	7.9 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM50	Nizd	Nd	Nizd	6.1 s-	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	7.3 s	Nizd	Nizd	5.1 s	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	
SMM51	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	5.5 d	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM59	Nizd	Nd	Nizd	6.5 s-	Nd	7.2 d	5.5 s-	7.5 d	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM60	Nizd	Nd	Nizd	6.9 s-	Nd	Nizd	4.3 d	6.9 d	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM67	2.9 d	Nd	3.0 d	5.8 s-	Nd	6.7 d	4.3 d	6.2 d	Nd	3.0 d	Nizd	4.0 s-	Nizd	3.0 d	Nizd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	
SMM69	Nizd	Nd	Nizd	7.0 s-	Nd	8.2 d	5.8 s-	5.6 d	Nd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	3.8 s-	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM70	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nd	5.5 d	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM71	Nizd	Nd	Nizd	5.2 s-	Nd	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM73	4.0 s-	Nd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	7.8 s2	Nizd	4.6 s	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nd	Nizd	5.9 s-	
SMM79	Nizd	Nd	Nizd	5.6 s-	Nd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
SMM80	Nizd	Nd	Nizd	4.4 s-	Nd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
Dry-salted cod																					
BCS21	7.7 d	7.6 d	5.5 d	8.0 d	7.7 d	3.0 d	4.8 d	4.7 d	5.8 d	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	4.9 d	
BCS22	9.9 s	9.7 s	9.8 s	12.7 s2	12.6 s2	3.0 d	5.4 d	5.2 d	6.5 s-	4.6 s-	11.0 s2	3.0 d	Nizd	3.0 d	7.5 s2	8.8 s2	8.3 s2	Nd	7.7 s2	10.5 s	
BCS24	5.5 d	Nizd	5.5 d	Nizd	7.7 d	3.0 d	5.0 d	3.0 d	5.6 d	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	
BCS25	6.3 d	7.1 d	6.8 d	Nizd	6.6 d	3.0 d	5.0 d	4.2 d	5.7 d	Nizd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	3.0 d	
BCS26	9.4 s	9.6 s	10.1 s	12.3 s2	10.5 s2	3.0 d	7.5 s	5.5 s-	6.7 s	Nizd	9.6 s2	3.0 d	3.0 d	3.0 d	3.9 s	9.8 s2	7.8 s2	Nd	7.1 s2	10.5 s	
BCS27	9.7 s	10.0 s	8.4 s	12.5 s2	13.4 s2	3.0 d	6.6 s	5.5 s-	Nizd	10.0 s2	13.9 s2	3.0 d	6.6 s-	Nizd	7.9 s2	8.8 s2	9.0 s2	Nd	5.1 s2	8.7 s	
BCS29	7.7 d	Nizd	6.6 d	7.2 d	Nizd	3.0 d	5.0 d	5.3 d	4.5 d	Nizd	Nizd	3.0 d	6.6 s-	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
BCS30	8.5 s	10.2 s	7.7 s	12.9 s2	11.0 s2	3.0 d	6.7 s	4.8 d	7.3 s	7.0 s-	14.2 s2	Nizd	7.5 s	3.0 d	8.3 s2	9.2 s2	9.1 s2	Nd	6.8 s2	11.0 s	
BCS31	9.3 s	10.9 s	9.1 s	12.1 s2	12.0 s2	3.0 d	6.7 s	4.9 s-	6.8 s	9.3 s2	13.6 s2	3.0 d	7.2 s	4.3 s-	7.8 s	6.7 s2	8.9 s2	Nd	7.8 s2	7.4 s	
BCS32	9.9 s	12.3 s	10.2 s	12.7 s2	12.2 s2	3.0 d	7.7 s	5.0 s-	8.0 s	8.9 s2	13.9 s2	3.0 d	7.3 s	3.0 d	6.2 s	9.5 s2	9.0 s2	Nd	7.7 s2	11.1 s	
BCS35	14.3 s	16.7 s	15.4 s	11.2 s2	12.0 s2	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nizd	7.2 s-	8.2 s	4.2 s-	7.5 s	6.2 s-	Nizd	4.9 s	6.5 s	Nd	5.1 s	8.3 s-	
BCS46	3.0 d	Nizd	Nizd	5.9 d	5.0 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	6.5 d	Nizd	Nizd	3.0 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
BCS50	3.0 d	Nizd	Nizd	5.7 d	5.1 d	3.0 d	3.0 d	Nizd	5.9 d	Nizd	9.4 s	Nizd	3.0 d	3.0 d	4.1 s	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
BCS53	10.0 s	10.7 s	12.4 s+	15.1 s2	15.5 s	3.0 d	11.2 s	9.3 s	12.2 s2	12.8 s2	Nd	10.6 s2	12.1 s2	12.2 s2	14.3 s2	13.9 s	11.7 s2	Nd	11.2 s2	14.9 s	
BCS58	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	3.0 d	Nizd	5.0 d	Nizd	Nizd	Nd	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	
BCS59	8.7 s	13.0 s	13.8 s	10.8 s2	12.8 s	3.0 d	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nizd	Nizd	8.7 s	Nizd	6.8 s	Nizd	Nd	Nizd	12.9 s	
BCS60	8.8 s	12.1 s	12.6 s	18.2 s2	15.7 s	3.0 d	11.3 s	8.2 s	11.3 s2	12.0 s2	Nd	11.5 s2	13.2 s2	12.3 s2	13.1 s2	13.5 s	12.0 s2	Nd	10.5 s2	15.1 s	

Table III.5. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms																			
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>E. faecium</i>			<i>P. acidilactici</i>		<i>B. thermosphacta</i>		<i>Shewanella</i> spp.		<i>P.s.fluorescens</i>	
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378
Dry-salted cod																				
BCS61	10.1 s	11.5 s	11.6 s	16.4 s2	15.1 s	3.0 d	10.8 s	9.4 s	10.6 s2	14.3 s2	Nd	11.2 s2	12.8 s2	11.9 s2	13.7 s2	13.5 s	13.2 s2	Nd	11.3 s2	13.9 s
BCS62	10.3 s	10.5 s	11.1 s	16.5 s2	15.3 s	3.0 d	9.5 s	8.9 s	11.3 s2	12.9 s2	Nd	10.6 s2	12.5 s2	10.7 s2	13.3 s2	11.8 s	11.2 s2	Nd	10.5 s2	14.2 s
BCS63	9.9 s	10.5 s	10.4 s	15.0 s2	15.7 s	3.0 d	10.3 s	7.8 s	10.9 s2	Nd	Nd	11.1 s2	12.1 s2	9.6 s2	12.3 s2	12.8 s	11.4 s2	Nd	10.2 s2	14.8 s
BCS64	10.1 s	12.4 s	12.6 s	14.4 s2	16.0 s	3.0 d	10.2 s	9.1 s	11.6 s2	12.2 s2	Nd	11.9 s2	Nd	12.1 s2	12.9 s2	11.9 s	13.5 s2	Nd	9.2 s2	12.9 s
BCS65	9.8 s	12.3 s	11.3 s	15.4 s2	15.7 s	3.0 d	10.7 s	9.1 s	11.1 s2	Nd	Nd	11.3 s2	14.3 s2	11.2 s2	12.4 s2	14.4 s	11.6 s2	Nd	10.0 s2	12.8 s
BCS66	11.2 s	12.0 s	11.5 s	16.4 s2	14.7 s	3.0 d	11.1 s	9.0 s	10.8 s2	16.1 s2	Nd	10.6 s2	13.3 s2	11.8 s2	12.6 s2	12.8 s	13.1 s2	Nd	10.2 s2	14.4 s
BCS67	9.9 s	11.0 s	11.5 s	17.9 s2	16.3 s	3.0 d	10.9 s	8.6 s	11.1 s2	16.0 s2	Nd	11.2 s2	13.3 s2	12.4 s2	13.8 s2	13.0 s	12.0 s2	Nd	10.6 s2	14.8 s
BCS68	11.2 s	12.6 s	10.6 s	15.9 s2	14.6 s	3.0 d	9.8 s	8.7 s	10.4 s2	15.2 s2	Nd	10.5 s2	12.5 s2	12.1 s2	13.5 s2	12.8 s	11.6 s2	Nd	10.3 s2	13.5 s
BCS69	9.5 s	12.3 s	10.9 s	15.3 s2	15.0 s	3.0 d	10.1 s	7.6 s	10.0 s2	Nd	Nd	11.6 s2	Nd	8.7 s2	11.7 s2	13.2 s	11.9 s2	Nd	9.1 s2	10.1 s
BCS70	10.1 s	11.6 s	11.6 s	17.6 s2	16.7 s	3.0 d	10.8 s	8.9 s	10.0 s2	Nd	Nd	11.9 s2	12.9 s2	11.0 s2	12.4 s2	13.7 s	Nizd	Nd	9.0 s2	12.7 s
BCS71	9.9 s	12.0 s	11.3 s	16.3 s2	16.9 s	3.0 d	10.4 s	9.3 s	10.5 s2	14.7 s2	Nd	12.1 s2	12.7 s2	11.6 s2	13.0 s2	13.5 s	12.2 s2	Nd	10.8 s2	13.9 s
BCS72	9.9 s	11.8 s	12.1 s	17.0 s2	16.7 s	3.0 d	10.7 s	9.3 s	11.6 s2	15.6 s2	Nd	10.6 s2	10.3 s2	11.5 s2	12.5 s2	14.3 s	12.8 s2	Nd	11.0 s2	13.4 s
BCS80	10.8 s	10.4 s	10.7 s	16.8 s2	15.0 s	3.0 d	10.3 s	8.5 s	10.7 s2	14.2 s2	Nd	10.8 s2	10.3 s2	11.8 s2	12.3 s2	13.6 s	11.8 s2	Nd	10.6 s2	13.1 s
BCS81	10.3 s	11.1 s	10.7 s	15.9 s2	15.5 s	3.0 d	10.4 s	8.1 s	10.5 s2	Nd	Nd	12.1 s2	11.8 s2	10.2 s2	11.9 s2	14.6 s	12.0 s2	Nd	8.1 s2	13.6 s
BCS82	9.0 s	12.2 s	11.0 s	16.2 s2	15.8 s	3.0 d	9.9 s	8.9 s	10.6 s2	15.8 s2	Nd	10.6 s2	12.2 s2	10.4 s2	11.8 s2	13.4 s	11.4 s2	Nd	9.1 s2	12.8 s
BCS83	9.3 s	11.3 s	11.4 s	16.1 s2	15.5 s	3.0 d	10.8 s	9.2 s	11.1 s2	17.9 s2	Nd	11.2 s2	12.7 s2	11.7 s2	13.0 s2	14.1 s	11.6 s2	Nd	9.4 s2	12.2 s
BCS84	9.9 s	11.0 s	11.8 s	14.5 s2	14.5 s	3.0 d	10.2 s	9.0 s	10.8 s2	13.1 s2	Nd	10.4 s2	11.9 s2	10.6 s2	12.7 s2	11.9 s	11.2 s2	Nd	10.1 s2	12.9 s
BCS85	10.0 s	11.2 s	10.9 s	16.3 s2	14.5 s	3.0 d	10.8 s	8.0 s	10.7 s2	14.5 s2	Nd	10.0 s2	11.4 s2	11.7 s2	14.0 s2	14.4 s	11.2 s2	Nd	9.9 s2	12.5 s
BCS86	8.2 s	11.9 s	11.2 s	14.5 s2	14.3 s	3.0 d	9.9 s	8.5 s	10.3 s2	14.3 s2	Nd	11.4 s2	Nd	10.3 s2	11.1 s2	12.6 s	11.4 s2	Nd	8.4 s2	10.9 s
BCS87	10.0 s	11.1 s	11.5 s	15.7 s2	15.2 s	3.0 d	10.4 s	9.0 s	11.3 s2	Nd	Nd	11.7 s2	Nd	9.1 s2	12.3 s2	13.6 s	10.9 s2	Nd	9.1 s2	13.0 s
BCS88	10.1 s	11.4 s	11.4 s	16.0 s2	15.8 s	3.0 d	10.6 s	9.3 s	11.7 s2	14.5 s2	Nd	11.9 s2	11.8 s2	9.9 s2	13.8 s2	13.3 s	11.5 s2	Nd	9.6 s2	12.1 s
BCS89	9.4 s	11.2 s	11.9 s	15.4 s2	12.5 s	3.0 d	9.7 s	9.2 s	11.2 s2	15.7 s2	Nd	10.8 s2	11.6 s2	9.7 s2	13.6 s2	13.0 s	11.7 s2	Nd	9.9 s2	13.9 s
BCS90	9.8 s	11.2 s	10.9 s	15.2 s2	13.6 s	3.0 d	9.6 s	8.2 s	9.9 s2	11.6 s2	Nd	10.9 s2	11.5 s2	11.7 s2	11.8 s2	13.6 s	12.2 s2	Nd	9.5 s2	14.7 s
BCS91	9.0 s	9.9 s	9.9 s	14.5 s2	13.6 s	3.0 d	9.2 s	9.2 s	10.9 s2	Nd	Nd	11.4 s2	Nd	10.2 s2	12.8 s2	11.0 s	10.6 s2	Nd	9.0 s2	11.7 s
BCS92	10.6 s	11.0 s	9.6 s	14.4 s2	14.1 s	3.0 d	10.6 s	9.2 s	10.8 s2	14.1 s2	13.5 s	11.4 s2	12.5 s2	10.1 s2	11.6 s2	11.8 s	12.6 s2	Nd	9.2 s2	11.1 s
BCS93	9.9 s	11.3 s	10.2 s	15.3 s2	14.8 s	3.0 d	9.7 s	9.9 s	10.7 s2	13.9 s2	14.1 s	11.8 s2	11.5 s2	10.4 s2	11.9 s2	12.3 s	12.6 s2	Nd	9.5 s2	11.6 s
BCS94	9.5 s	11.4 s	10.4 s	13.4 s2	14.1 s	3.0 d	10.6 s	9.7 s	10.6 s2	Nd	Nd	11.9 s2	11.3 s2	9.9 s2	12.6 s2	11.5 s	11.6 s2	Nd	9.2 s2	12.9 s
BCS95	8.8 s	12.2 s	10.0 s	16.2 s2	14.5 s	3.0 d	10.6 s	8.9 s	10.1 s2	11.9 s2	Nd	11.6 s2	11.2 s2	10.5 s2	12.7 s2	12.3 s	12.2 s2	Nd	10.2 s2	13.1 s
BCS96	9.3 s	11.1 s	10.6 s	15.7 s2	12.8 s	3.0 d	9.8 s	9.3 s	10.6 s2	Nd	Nd	11.1 s2	11.1 s2	10.6 s2	12.2 s2	10.9 s	11.6 s2	Nd	9.2 s2	11.6 s
BCS97	8.6 s	14.3 s+	11.4 s	14.1 s2	13.9 s	3.0 d	5.5 s2	5.6 s-	5.7 s	8.4 s	11.1 s	Nizd	Nizd	8.7 s	6.2 s2	8.4 s	4.5 d	Nd	Nizd	10.3 s
BCS98	8.6 s	11.0 s	10.5 s	15.6 s2	14.5 s	3.0 d	9.7 s	9.5 s	10.9 s2	12.9 s2	17.4 s	10.5 s2	12.2 s2	10.2 s2	12.4 s2	13.1 s	10.7 s2	Nd	9.4 s2	11.4 s
BCS99	9.9 s	11.1 s	10.0 s	15.5 s2	13.5 s	3.0 d	10.2 s	9.0 s	10.4 s2	13.9 s2	17.8 s	11.6 s2	11.0 s2	10.4 s2	13.0 s2	13.5 s	11.6 s2	Nd	8.7 s2	12.1 s
BCS100	10.5 s	9.8 s	11.2 s	14.8 s2	12.3 s	3.0 d	10.4 s	9.1 s	10.3 s2	14.9 s2	14.1 s	10.5 s2	11.9 s2	10.1 s2	12.0 s2	12.1 s	10.1 s2	Nd	9.1 s2	13.2 s

*Direct antimicrobial activity as determined by a SOAT, and expressed as the diameter of the inhibition zones in mm. Inhibition zones are differentiated as follows: d= diffuse, s= slightly sharp, s+= sharp, s++= very sharp, s2= greatly sharp, and R= halos with resistant cells. Nizd, no inhibition zone detected. Nd, Not determined. *See Table III.1.

Table III.7. Bacteriocin activity of the selected 64 LAB against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria^a.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms ^b																			
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>Carnobacterium</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.		<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>E. faecium</i>			<i>P. acidilactici</i>		<i>B. thermosphacta</i>		<i>Shewanella</i> spp.		<i>Ps. fluorescens</i>	
	935	936	4032	4016	4020	4493	4531	BB24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	347	847	5071	323	5194	378
Squid																				
CV1	12.4 s-	11.2 s	15.1 s2	13.8 s	14.7 s R	3.0 D	Nizd	Nizd	Nizd	15.1 s2	13.0 s	14.0 s2	14.9 s	12.9 s	7.8 s	16.3 s- R	12.6 s	Nizd	13.0 s	Nizd
CV2	14.3 s	13.3 s2 R	14.4 s2	15.7 s	16.8 s R	9.0 s	Nizd	Nizd	Nizd	12.6 s2	16.0 s	Nizd	14.3 s	14.8 s	12.9 s2	19.3 s- R	13.5 s	Nizd	14.9 R	Nizd
Rainbow trout																				
TPP2	13.8 s R	13.1 s2 R	13.2 s2 R	15.3 s	16.4 s R	9.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	12.6 s2	15.4 s	Nizd	14.7 s	12.2 s	12.2 s2	18.7 s- R	11.8 s	Nizd	14.1 R	Nizd
TPP3	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
TPM74	15.2 s R	15.7 s2 R	14.6 s2 R	15.7 s	17.3 s R	10.6 s	3.0 D	Nizd	Nizd	14.2 s2	16.7 s	Nizd	15.0 s	15.2 s	13.9 s2	19.8 s- R	13.3 s	Nizd	15.6 R	Nizd
TPM76	15.8 s R	15.2 s2 R	15.9 s2	17.4 s	17.7 s R	11.0 s	8.6 s-	Nizd	Nizd	14.8 s2	18.1 s	Nizd	14.6 s	15.4 s	15.0 s2	18.8 s- R	13.0 s	Nizd	15.2 R	Nizd
Seabass																				
LPP29	13.5 s R	15.4 s2 R	14.6 s2	17.4 s R	16.8 s R	10.2 s	8.7 s	Nizd	9.2 s	13.8 s2	17.7 s	Nizd	15.4 s	14.6 s	14.3 s2	18.9 s- R	14.4 s	Nizd	15.6 R	Nizd
LPP32	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
LPV46	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
LPV57	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	9.5 s	Nizd	10.1 s	Nizd	Nizd	12.2 D	Nizd	Nizd	13.7 s	Nizd	Nizd	Nizd	13.8 s-	Nizd
LPM78	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
LPM83	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Cockle																				
B5	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
B11	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	14.3 s2 R	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
B13	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
B27	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
B43	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Octopus																				
P38	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P50	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P61	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P62	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P63	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P68	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
P77	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Sardine																				
SDP7	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SDP10	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SDM37	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Cold-smoked Atlantic salmon																				
SMA3	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA7	13.4 s R	13.8 s2 R	12.4 s2	13.8 s	14.4 s R	3.0 D	7.9 s	Nizd	9.0 s	14.4 s2	15.0 s	Nizd	14.4 s	14.2 s	14.9 s2	16.3 s- R	12.3 s	Nizd	14.7 R	Nizd
SMA8	15.5 s R	15.1 s2 R	13.8 s2	15.5 s	16.2 s R	9.8 s	8.7 s	Nizd	8.8 s	14.4 s2	16.2 s	Nizd	14.8 s	14.4 s	16.0 s2	18.5 s- R	12.9 s	Nizd	14.2 R	Nizd
SMA10	15.8 s R	15.8 s2 R	15.0 s2	8.1 D	8.0 D	10.2 s	Nd	Nd	9.0 s	15.0 s2	15.6 s	Nd	Nd	Nd	15.2 s2	20.2 s- R	13.7 s	Nizd	14.5 R	Nizd
SMA17	Nizd	Nizd	Nizd	8.0 D	9.0 D	10.0 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	10.7 s-	Nizd	Nizd	Nizd	10.8 s	Nizd	Nizd	Nizd
SMA36	15.1 s R	15.1 s2 R	14.2 s2	16.1 s R	16.3 s R	11.1 s	7.0 s-	Nizd	7.8 s	13.9 s2	17.6 s	Nizd	13.9 s	13.2 s	14.0 s2	16.7 s- R	13.3 s	Nizd	15.3 R	Nizd
SMA40	14.3 s R	14.2 s2 R	14.9 s2	15.9 s R	15.8 s R	11.1 s	6.7 D	Nizd	7.5 s	13.1 s2	16.2 s	Nizd	13.9 s	13.8 s	13.4 s2	17.7 s- R	13.2 s	Nizd	14.3 R	Nizd

Table III.7. Continued.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms ^a															
	<i>L. monocytogenes</i>				<i>Carnobacterium</i> spp.				<i>Lactococcus</i> spp.				<i>Lactobacillus</i> spp.			
	935	936	4032		4016	4020	4493	4531	BR24	570	Lb706	2714	L50	P13	T136	
Marinated Atlantic salmon																
SMM169	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMM173	Nizd	9.1 s2	8.2 s2	Nd	Nd	Nd	Nizd	Nd	Nd	Nizd	Nizd	9.1 s-	Nd	Nd	Nd	Nizd
Fresh Atlantic salmon																
SME4	16.7 s R	18.3 s2	15.6 s2 R	16.7 s	16.7 s	Nizd	12.6 s2	Nizd	12.2 s	13.3 s2	20.9 s2	15.4 s+	16.5 s	Nizd	Nizd	Nizd
SME8	14.4 s R	14.9 s2	15.6 s2 R	16.2 s	16.7 s R	10.7 s	7.4 s-	Nizd	9.2 s	14.9 s2	17.0 s	Nizd	15.4 s	14.9 s	15.2 s2	Nizd
SME10	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME19	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME20	16.7 s R	17.4 s2 R	15.2 s2	17.0 s R	17.9 s	Nizd	12.4 s2	Nizd	11.4 s	14.2 s2	19.9 s2	15.0 s+	16.7 s	Nizd	Nizd	Nizd
SME37	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME39	13.5 s R	13.9 s2 R	13.6 s2 R	16.6 s R	15.4 s R	9.6 s	8.0 s	Nizd	9.0 s	13.8 s2	16.7 s	Nizd	16.5 s	13.1 s	13.7 s2	Nizd
SME54	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME55	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME60	18.4 s R	18.3 s2	16.8 s2	18.6 s R	19.1 s	3.0 D	12.6 s2	Nizd	11.1 s	15.4 s2	20.8 s2	Nizd	16.6 s	Nizd	Nizd	Nizd
SME69	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Albacore																
BNM58	15.3 s R	16.9 s2 R	16.7 s2	17.7 s R	17.8 s R	12.9 s	9.5 s2	8.6 s-	10.1 s	15.8 s2	18.2 s	8.3 s-	16.7 s	15.3 s	16.2 s2	Nizd
Norway lobster																
CGM16	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
CGM17	14.6 s R	15.3 s2 R	15.1 s2 R	17.1 s	16.9 s R	12.5 s	7.8 s	Nizd	8.9 s	14.7 s2	17.0 s	7.0 D	14.3 s	15.1 s	15.4 s2	Nizd
CGV67	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Dry-salted cod																
BCS22	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS26	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS27	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS30	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS32	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS35	24.7 s2 R	25.5 s2	24.4 s2 R	16.9 s2 R	16.1 s2 R	3.0 D	Nizd	Nizd	Nizd	12.7 s2	17.9 s	14.2 s2	15.6 s2	14.5 s R	Nizd	Nizd
BCS53	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS59	15.8 s R	16.0 s2 R	16.8 s2	15.8 s	15.4 s R	12.1 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	17.1 s	Nizd	11.2 s	15.7 s R	Nizd	Nizd
BCS60	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS64	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS72	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS97	16.5 s	16.2 s2 R	16.0 s2	17.5 s	17.6 s R	13.5 s	8.6 s-	Nizd	9.5 s	13.9 s2	18.0 s	8.0 s	13.3 s	14.0 s	14.3 s2	Nizd
BCS100	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd

^a Extracellular antimicrobial activity as determined by an ADT₁ and expressed as the diameter of the inhibition zones in mm. Inhibition zones are differentiated as follows: D= diffuse, s-= slightly sharp, s= sharp, s+= very sharp, s2= greatly sharp, and R= halos with resistant cells. Nizd, no inhibition zone detected. Nd= Not determined. ^b See Table III.1.

Table III.8. Bacteriocin activity of the 25 bacteriocinogenic LAB against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria^a.

Sample/ Isolate	Indicator microorganisms ^b																			
	Listeria spp.				Clostridium spp.				St. aureus				Salmonella spp.							
	911	932	935	936	4031	4032	913	931	551	581	4610	4611	4612	376	976	4459	4466	443	554	4396
Squid																				
CV1	11.3 s-	11.7 D	10.9 s-	12.2 s2	12.1 s	11.7 s2	14.0 s2	9.7 s2	15.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
CV2	9.0 s	10.5 D	13.2 s R	13.9 s2 R	12.8 s	13.1 s2	16.6 s2	10.0 s2 R	16.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	7.8 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Rainbow trout																				
TPP2	8.6 s	10.7 s- R	13.9 s R	13.8 s2 R	13.3 s	13.6 s2	15.5 s2	11.5 s2 R	16.7 s	Nizd	7.1 s	8.0 s2	3.0 D	8.3 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
TPM74	10.9 s	12.6 s- R	14.8 s R	15.3 s2 R	14.6 s	14.8 s2 R	17.9 s2 R	13.0 s2 R	18.3 s	Nizd	8.0 s2	9.0 s2	7.7 s	9.1 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
TPM76	11.4 s	13.5 s2 R	16.1 s R	16.0 s2 R	15.3 s	14.4 s2	17.9 s2 R	13.4 s2 R	18.7 s	Nizd	8.6 s2	9.2 s2	9.1 s	9.6 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Bass																				
LPP29	11.4 s	13.2 s- R	14.7 s R	15.3 s2 R	14.2 s	15.2 s2	17.0 s2	12.8 s2 R	18.5 s	Nizd	9.1 s2	10.0 s2	9.3 s	10.7 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
LPV57	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.3 s	Nizd	13.9 s R	15.0 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Cockle																				
B11	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Cold-smoked Atlantic salmon																				
SMA7	10.1 s	10.2 s- R	14.5 s R	13.9 s2 R	13.6 s	13.8 s2	16.5 s2	12.5 s2 R	17.2 s	Nizd	8.2 s2	10.1 s2	9.2 s R	10.7 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA8	9.6 s	11.2 s- R	14.1 s R	14.6 s2 R	14.7 s	13.8 s2	16.6 s2	12.5 s2 R	17.6 s	Nizd	9.2 s2	10.0 s2	8.9 s	10.4 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA10	12.2 s	13.8 s R	15.7 s R	15.8 s2 R	14.8 s	15.8 s2 R	17.4 s2	13.5 s2 R	18.3 s	Nizd	9.5 s2	10.1 s2	10.2 s	11.4 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA17	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	9.4 s2	Nizd	11.4 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA36	11.2 s	12.8 s R	15.7 s R	15.3 s2 R	11.5 s	14.5 s2 R	16.8 s2	13.4 s2 R	18.2 s	Nizd	8.1 s2	9.1 s2	8.8 s	9.6 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SMA40	10.6 s	11.6 s R	14.7 s R	15.1 s2 R	14.8 s	13.6 s2	18.0 s2	12.3 s2 R	17.9 s	Nizd	8.2 s2	8.8 s2	9.0 s	10.0 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Marinated Atlantic salmon																				
SMM73	7.5 s	Nizd	3.0 D	9.6 s	3.0 D	9.5 s2	11.6 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Fresh Atlantic salmon																				
SME4	15.5 s2	17.4 s2 R	16.0 s2 R	17.5 s2 R	16.6 s2	16.7 s2 R	18.2 s2	15.5 s2 R	18.4 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME8	10.8 s	12.7 s R	14.2 s R	15.8 s2 R	14.7 s	14.4 s R	16.4 s2	13.5 s2 R	17.5 s2	Nizd	10.2 s2	10.3 s2	10.0 s2	10.0 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME29	15.4 s2	16.7 s2 R	16.6 s2 R	18.4 s2 R	17.9 s2	15.8 s2 R	19.8 s2	15.1 s2 R	18.3 s2 R	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME70	12.2 s	11.4 s R	14.1 s R	14.7 s2 R	14.0 s	12.6 s2 R	16.7 s2	12.2 s2 R	18.7 s2	Nizd	9.1 s2	10.6 s2	9.6 s R	9.5 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
SME60	16.5 s2	18.9 s2 R	17.0 s2 R	18.6 s2 R	16.6 s2	17.9 s2 R	18.8 s2	15.6 s2 R	19.5 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Albacore																				
BNM58	13.5 s2	14.8 s R	17.1 s R	16.6 s2 R	16.0 s	15.9 s2 R	19.1 s2	15.0 s2 R	13.6 s2 R	Nizd	10.7 s2	10.9 s2	11.1 s2 R	11.0 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Norway Lobster																				
CGM17	11.8 s+	12.3 s R	15.5 s R	15.2 s2 R	15.1 s	14.2 s2	17.6 s2	13.4 s2 R	17.3 s2 R	Nizd	9.5 s2	10.7 s2	9.6 s R	9.7 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
Dry-salted cod																				
BCS35	16.1 s2	22.0 s2 R	24.0 s2 R	25.3 s2 R	19.3 s2	24.3 s2 R	27.4 s2	21.9 s2 R	21.0 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS59	15.4 s+	13.8 s R	15.5 s R	15.3 s2 R	13.4 s	15.2 s2	17.4 s2	14.1 s2 R	17.4 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
BCS97	13.7 s2	15.3 s R	16.3 s R	16.9 s2 R	15.7 s	15.6 s2	18.7 s2	14.3 s2 R	18.7 s2	Nizd	9.5 s2	10.2 s2	9.1 s2 R	9.4 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd

Table III.11. Bacteriocin self- and cross-immunity of the 25 bacteriocinogenic LAB^a.

Strain	Indicator microorganisms													
	<i>E. faecium</i>													
	CV1	CV2	TPP2	TPM74	TPM76	LPP29	SMA7	SMA8	SMA10	SMA36	SMA40	SMF4	SMF8	SMF20
<i>E. faecium</i> CV1	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	14.1 s	Nizd	Nizd	12.7 s	12.7 s	11.9 s	12.7 s	12.5 s
<i>E. faecium</i> CV2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	8.3 s	Nizd	Nizd	8.9 s	9.0 s	13.3 s	Nizd	13.6 s
<i>E. faecium</i> TPP2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	10.8 s	Nizd	Nizd	9.2 s	10.2 s	12.9 s	Nizd	12.9 s
<i>E. faecium</i> TPM74	8.2 s-	10.2 D	10.4 s-	Nizd	8.2 D	11.2 s-	10.3 s	Nizd	Nizd	9.1 s	11.0 s	13.9 s	Nizd	14.0 s
<i>E. faecium</i> TPM76	8.4 s-	10.0 D	10.7 s-	8.4 D	Nizd	12.2 s	9.4 s	Nizd	Nizd	9.3 s	11.3 s	12.9 s	Nizd	14.5 s
<i>E. faecium</i> LPP29	10.4 s-	8.8 D	10.6 s-	Nizd	Nizd	Nizd	11.3 s	Nizd	Nizd	10.2 s	10.8 s	14.8 s	Nizd	14.6 s
<i>E. faecium</i> SMA7	12.6 s	Nizd	10.5 s-	Nizd	Nizd	11.7 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	14.0 s	Nizd	13.3 s
<i>E. faecium</i> SMA8	12.8 s	Nizd	10.6 s-	Nizd	Nizd	11.6 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.2 s	Nizd	14.8 s
<i>E. faecium</i> SMA10	12.9 s	Nizd	9.3 s-	Nizd	Nizd	11.3 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	16.1 s	Nizd	16.5 s
<i>E. faecium</i> SMA36	12.4 s	9.5 s-	10.0 s-	Nizd	8.5 D	10.3 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.0 s	Nizd	15.3 s
<i>E. faecium</i> SMA40	11.4 s	9.8 D	10.0 s-	Nizd	3.0 D	10.8 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.3 s	Nizd	14.6 s
<i>E. faecium</i> SMF4	18.6 s2	17.8 s2	17.9 s2	16.5 s2	17.0 s2	18.0 s2	15.3 s	Nizd	Nizd	13.7 s	14.8 s	Nizd	14.6 s	Nizd
<i>E. faecium</i> SMF8	14.9 s	12.7 s R	12.7 s	11.1 s-	10.2 s-	12.5 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	14.3 s	Nizd	15.0 s
<i>E. faecium</i> SMF20	18 s2	17.3 s2	17.8 s2	16.6 s2	16.6 s2	18.3 s2	14.4 s	Nizd	Nizd	14.1 s	14.8 s	Nizd	15.0 s	Nizd
<i>E. faecium</i> SMF39	12.6 s-	10.2 D	10.3 s- R	Nizd	Nizd	11.3 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	12.9 s	Nizd	13.9 s
<i>E. faecium</i> SMF60	18.4 s2	18.8 s2	16.2 s2	17.4 s2	15.6 s2	19.2 s2	15.0 s	Nizd	Nizd	14.3 s	14.4 s	Nizd	15.3 s	Nizd
<i>E. faecium</i> BNM58	15.7 s2	14.5 s	13.0 s	12.1 s	10.4 s	14.5 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	15.4 s	7.8 s-	17.2 s
<i>E. faecium</i> CGM17	13.8 s2	12.6 s	10.1 s	11.7 s	9.5 s	13.4 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.8 s	Nizd	15.1 s
<i>E. faecium</i> BCS59	10.6 s2	10.1 s	8.2 s	8.7 s	8.7 s	9.8 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	14.9 s	Nizd	15.4 s R
<i>E. faecium</i> BCS97	12.8 s2	11.4 s2	10.1 s	9.9 s2	9.9 s	11.2 s-	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	15.7 s	7.9 s-	15.6 s
<i>Lb. curvatus</i> BCS35	15.4 s3	15.0 s3	13.7 s2	14.9 s2	13.7 s2	15.8 s2	12.8 s2	Nizd	Nizd	13.1 s2	12.8 s2	12.9 s	14.1 s2	14.2 s
<i>Lb. sakei</i> B11	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
<i>Lb. sakei</i> SMA17	11.0 D	9.6 D	10.2 s-	Nizd	10.9 D	9.5 s-	11.0 D	Nizd	Nizd	10.1 D	Nizd	Nizd	8.9 s-	Nizd
<i>Lb. sakei</i> SMM73	11.5 D	11.5 s-	11.1 s	Nizd	10.8 s	10.7 s-	3.0 D	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	10.2 s	Nizd
<i>P. pentosaceus</i> LPV57	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	13.1 s2	15.1 s2	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd

Table III.11. Continued.

Strain	Indicator microorganisms										
	<i>E. faecium</i>						<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. sakei</i>			<i>P. pentosaceus</i>
	SMF39	SMF60	BNM58	CGM17	BCS59	BCS97	BCS35	B11	SMA17	SMM73	LPV57
<i>E. faecium</i> CV1	13.6 s	13.6 s	12.4 s	13.8 s2	16.8 s2	13.9 s2	Nizd	Nizd	3.0 D	Nizd	Nizd
<i>E. faecium</i> CV2	Nizd	13.7 s	Nizd	Nizd	13.2 s2	Nizd	Nizd	Nizd	9.3 s2	8.8 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> TPP2	Nizd	13.7 s	Nizd	Nizd	13.7 s2	Nizd	Nizd	Nizd	10.5 s2	9.6 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> TPM74	Nizd	14.9 s	Nizd	Nizd	14.1 s2	Nizd	Nizd	9.6 s-	11.6 s2	11.3 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> TPM76	Nizd	14.4 s	Nizd	Nizd	14.2 s2	Nizd	Nizd	9.7 s-	12.4 s2	11.5 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> LPP29	Nizd	16.7 s	Nizd	Nizd	13.6 s2	Nizd	Nizd	10.1 s-	12.1 s2	13.3 s2	3.0 D
<i>E. faecium</i> SMA7	Nizd	14.8 s	Nizd	Nizd	12.9 s2	Nizd	Nizd	9.7 D	12.7 s2	12.0 s2	3.0 D
<i>E. faecium</i> SMA8	Nizd	15.7 s	Nizd	Nizd	13.2 s2	Nizd	Nizd	9.4 D	13.0 s2	11.4 s2	3.0 D
<i>E. faecium</i> SMA10	Nizd	18.1 s	Nizd	Nizd	15.9 s2	Nizd	Nizd	9.5 s-	12.4 s2	13.3 s2	8.1 s-
<i>E. faecium</i> SMA36	Nizd	16.5 s	Nizd	Nizd	12.8 s2	Nizd	Nizd	10.5 s-	12.2 s2	12.7 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> SMA40	Nizd	14.7 s	Nizd	Nizd	12.4 s2	Nizd	Nizd	10.1 s-	12.3 s2	11.6 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> SMF4	14.2 s	Nizd	15.0 s	13.3 s	14.0 s	13.5 s	Nizd	10.9 s2	11.8 s2	11.7 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> SMF8	Nizd	16.7 s	Nizd	Nizd	12.4 s	Nizd	6.6 s	9.2 s-	12.1 s2	13.1 s2	8.0 s-
<i>E. faecium</i> SMF20	13.8 s	Nizd	15.4 s	13.9 s	13.9 s	13.8 s	Nizd	10.8 s2	11.9 s2	10.8 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> SMF39	Nizd	14.0 s	Nizd	Nizd	11.3 s	Nizd	Nizd	8.6 D	12.5 s2	11.7 s2	8.0 s-
<i>E. faecium</i> SMF60	15.6 s	Nizd	15.6 s	14.3 s	16.0 s	14.1 s	Nizd	9.7 s2	11.5 s2	11.3 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> BNM58	7.8 s	17.4 s	Nizd	7.1 s-	15.4 s2	Nizd	7.4 s	10.1 s-	14.5 s2	14.8 s2	9.3 s2
<i>E. faecium</i> CGM17	Nizd	15.5 s	Nizd	Nizd	12.7 s	Nizd	6.7 s	9.1 s-	13.1 s2	12.3 s2	7.8 s
<i>E. faecium</i> BCS59	Nizd	13.8 s	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	9.4 s	9.2 s	10.3 s2	Nizd
<i>E. faecium</i> BCS97	Nizd	16.0 s	Nizd	7.8 s-	11.5 s	Nizd	6.4 s	10.9 s2	12.8 s2	12.2 s2	7.5 s-
<i>Lb. curvatus</i> BCS35	13.0 s2	13.2 s	13.7 s2	13.9 s2	14.6 s2	13.7 s2	Nizd	11.9 s2	12.7 s2	11.3 s2	Nizd
<i>Lb. sakei</i> B11	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	11.2 s2	10.7 s2	Nizd
<i>Lb. sakei</i> SMA17	Nizd	Nizd	8.2 s-	9.0 s-	10.8 s	9.2 D	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
<i>Lb. sakei</i> SMM73	Nizd	Nizd	9.7 s-	9.2 s-	12.6 s	9.1 D	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd
<i>P. pentosaceus</i> LPV57	Nizd	Nizd	9.6 D	10.0 D	Nizd	10.2 D	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd	Nizd

^aExtracellular antimicrobial activity as determined by an ADT, and expressed as the diameter of the inhibition zones in mm. Inhibition zones are differentiated as follows: D= diffuse, s= slightly sharp, s= sharp, s+= very sharp, s2= greatly sharp and R= halos with resistant cells. Nizd, no inhibition zone detected.

CAPÍTULO IV

Potencial biotecnológico y evaluación de la seguridad de *Lactobacillus curvatus* BCS35: una cepa aislada de bacalao salado (*Gadus morhua*) con una potente actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*

CHAPTER IV

Biotechnological potential and safety evaluation of Lactobacillus curvatus BCS35: a strain isolated from dry-salted cod (Gadus morhua) with a strong antimicrobial activity against Listeria monocytogenes

IV.1. ABSTRACT

In a previous work (Chapter III), we isolated 197 LAB strains with antimicrobial activity from fish, seafood and fish products, from which 64 were selected for further characterization. From these strains, 25 LAB (20 *Enterococcus faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. and 1 *Pediococcus pentosaceus*) were shown to be bacteriocin producers (*i.e.* bacteriocinogenic strains). *Lactobacillus sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 and *Lactobacillus curvatus* BCS35 were selected for further characterization because of their broad antimicrobial spectrum and strong inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. By means of polymerase chain reaction (PCR) analysis with specific primers for curvacin A (CurA), sakacin P (SakP), and sakacin Q (SakQ) structural genes (*curA*, *sppA* and *sppQ*, respectively), it was shown that *Lb. curvatus* BCS35 was the only lactobacilli strain that amplified *sppA* and *sppQ*. Comparative bacteriocin activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 (SakP-producer) and *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1-producer) against *Listeria* spp. and LAB strains was determined by an agar well-diffusion test (ADT) and a microtiter plate assay (MPA). By using a purification procedure that included ammonium sulphate precipitation, gel filtration, cation exchange and hydrophobic interaction chromatographies, and reverse-phase liquid chromatography in a FPLC system, it was determined that the antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35 is due to the production of, at least, two bacteriocins. Both purified peptides, termed curvacin G14 (CurG14) and curvacin G15 (CurG15), were subjected to mass spectrometry analysis, revealing that they are 4,460.9 and 4,362.3 Da in size, respectively. N-terminal amino acid and/or nucleotide sequencing showed that CurG14 and CurG15 are very similar or identical to the class IIa bacteriocins SakP, previously identified in *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992), and sakacin X (SakX), firstly described in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), respectively. In fact, CurG14 only differs from SakP at position 12 (Tyr instead of His), which is in agreement with their differences in molecular mass (4,460.9 and 4,435.0 Da, respectively). Purified CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP, and pediocin PA-1 (PedPA-1) were challenged against several strains of *Listeria* spp. and LAB in order to: (i) compare their specific antimicrobial activities, and (ii) determine if the substitution Tyr12/His12 in CurG14/SakP exerts any effect on the bacteriocin potency and/or specificity. Finally, the *in vitro* safety of *Lb. curvatus* BCS35 was determined by susceptibility testing against several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine and analysis of hemolysin, gelatinase and protease activities.

IV.2. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) and/or their metabolites can be used as food biopreservatives, in conjunction with other hurdles, to control spoilage and food-borne pathogenic bacteria and to extend the shelf-life of food. The widely known preserving capability of LAB is mainly due to the production of fermentation end products (*e.g.*, lactic acid) and ribosomally-synthesized antimicrobial peptides, referred to as bacteriocins. LAB bacteriocins display antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive and, to a lesser extent, Gram-negative bacteria, including spoilage and food-borne

pathogenic microorganisms (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Line *et al.*, 2008). These antimicrobials may be classified into three main classes: (i) the lantibiotics, or post-translationally modified peptides; (ii) the non-modified, small, heat stable peptides; and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins (Nes *et al.*, 1996; Nes and Holo, 2000; Eijsink *et al.*, 2002). Class II bacteriocins have been further subdivided into five subclasses: the subclass IIa (pediocin-like bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC); the subclass IIb (two-peptide bacteriocins); the subclass IIc (leaderless bacteriocins); the subclass IId (circular bacteriocins), and the subclass IIe (other peptide-bacteriocins) (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). The subclass IIa bacteriocins are normally referred to as pediocin-like bacteriocins since pediocin PA-1 (PedPA-1) was the first characterized member of this subclass. These bacteriocins are small (< 10 kDa), heat-stable, unmodified peptides containing between 37 and 48 amino acids, and are usually positively charged at a neutral pH, with pI values ranging from 8 to 10. Pediocin-like bacteriocins have similar sequences, especially in their hydrophilic, cationic N-terminal half, which contains a highly conserved motif (YGNGVxC) and, at least, two cysteine residues joined by a disulfide bridge, which is required for full antimicrobial activity (Ennahar *et al.*, 2000; van Belkum and Stiles, 2000; Drider *et al.*, 2006; Fimland *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Rihakova *et al.*, 2009). Their amphiphilic or hydrophobic C-terminal half is somehow more variable, and according to sequence similarities and differences, a further division of the class IIa bacteriocins into 3 or 4 subgroups has been suggested (Fimland *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). The subclass IIb bacteriocins consist of two peptides, both of which are required for full antimicrobial activity. Most class IIa and IIb bacteriocins are ribosomally synthesized as biologically inactive precursors (prebacteriocins) containing an N-terminal extension (the so-called double-glycine-type leader sequence or the *sec*-dependent signal peptide), which is cleaved off concomitantly with secretion of the active bacteriocin (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Oppegård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010). Production of most class II bacteriocins require at least, four genes: (i) the structural bacteriocin gene, encoding a preprobacteriocin; (ii) the immunity gene encoding an immunity protein that protects the bacteriocin producer from its own bacteriocin; (iii) a gene encoding an ATP-binding cassette transporter (ABC-transporter) necessary for secretion; and (iv) a gene encoding an accessory protein implicated in the transport process whose exact function is not known (Håvarstein *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 2000; Garneau *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2010). Another set of genes that is responsible for the control of the production of many, but not all, bacteriocins is the so-called three-component regulatory system, which regulates the production of the bacteriocin by a typical peptide pheromone-based quorum-sensing system (Nes and Eijsink, 1999). This regulation system consists of a bacteriocin-like peptide pheromone (inducing factor), a transmembrane histidine protein kinase (pheromone receptor), and a cytosolic response regulator (Kleerebezem *et al.*, 1997; Eijsink *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006).

The genus *Lactobacillus* constitutes a large and diverse group amongst LAB, and many species are present in dairy, meat, vegetable and fish products (Stiles, 1996; Claesson *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2011). Lactobacilli are also part of the normal gastrointestinal microbiota of humans and animals (Tannock, 2004; Vaughan *et al.*, 2005; Bernardeau *et al.*, 2008), and several *Lactobacillus* strains have been associated with health benefits, motivating their use as probiotics (Sanders, 2003; Zhou *et al.*, 2005). On the other hand, occasional opportunistic infections caused by lactobacilli have been reported (Bessis *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006). Nevertheless, it is worth mentioning that most *Lactobacillus* spp. (for example, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*) and LAB species have been proposed by the European Food Safety Authority (EFSA) for the Qualified Presumption of Safety (QPS) status, which is aimed to allow strains with an established history of safety to enter the market without extensive testing requirements (EFSA 2004; EFSA 2005a, 2005b). With regard to this, the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) has recently updated the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance (EFSA, 2008, 2011, 2012), which allows distinguishing strains harbouring acquired antimicrobial resistance from susceptible strains. According to these criteria, intrinsic resistance and resistance due to mutation of chromosomal genes pose a low risk of horizontal dissemination, and such strains would be therefore acceptable for food consumption; however, acquired resistance mediated by added genes (*e.g.*, transposon-encoded) is considered as posing a high potential for horizontal spread and, consequently, may present a risk for public health. In accordance to EFSA, the only safety qualification required for strains belonging to LAB species regarded as QPS is to demonstrate the absence of acquired antibiotic resistance (EFSA 2005a, 2005b; EFSA 2007).

Many *Lactobacillus* species are associated with food production because of their preservative action and/or enhancement of food flavour, texture and nutritive value (Stiles, 1996; Claesson *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Giraffa *et al.*, 2010; Kleerebezem *et al.*, 2010). In particular, the closely related species *Lb. sakei* and *Lb. curvatus* are primarily associated with meat and fish fermentation (Claesson *et al.*, 2007; McLeod *et al.*, 2010), and it is frequent the isolation of bacteriocinogenic strains from these food environments (Lyhs, 2002; Työppönen *et al.*, 2003; Cocolin *et al.*, 2004; Rantsiou *et al.*, 2005; Urso *et al.*, 2006; Héquet *et al.*, 2007; Dortu *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2011). To date, several bacteriocins are known to be produced by *Lb. sakei* strains, namely, sakacin A (SakA) (Schillinger and Lucke, 1989; Holck *et al.*, 1992), sakacin M/lactocin S (Sobrino *et al.*, 1992; Skaugen *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998b), sakacin P (SakP) (Tichaczek *et al.*, 1994), sakacin 674 (Holck *et al.*, 1994), sakacin B (Samelis *et al.*, 1994), sakacin K (Hugas *et al.*, 1995), bavaricin MN (Kaiser and Monteville, 1996), sakacin T (SakT) (Aymerich *et al.*, 2000), sakacin G (Simon *et al.*, 2002), sakacin X (SakX) (Vaughan *et al.*, 2003), and sakacin Q (SakQ) (Mathiesen *et al.*, 2005). The bacteriocins produced by *Lb. curvatus* strains include curvacin A (CurA) (Tichaczek *et al.*, 1993), which is identical to SakA; curvaticin 13 (Sudirman *et al.*, 1993), and curvaticin FS47 (Garver and Muriana, 1994). Moreover, recent studies described the presence of genes encoding different sakacins in *Lb. curvatus* strains (Cocolin and Rantsiou, 2007; Héquet *et al.*, 2007; Dortu *et al.*, 2008). Likewise, the

capability of lactobacilli to produce multiple bacteriocins has been already reported (Vaughan *et al.*, 2001, 2003; Mathiesen *et al.*, 2005; Héquet *et al.*, 2007; Cocolin and Rantsiou 2007; Prins *et al.*, 2010). In this respect, the strain *Lb. sakei* 5, isolated from malt, produces SakP, SakX, and the two-peptide bacteriocin SakT (SakT_α and SakT_β) (Vaughan *et al.*, 2003, 2004). Moreover, Mathiesen *et al.* (2005) described the purification and characterization of SakQ in SakP-producing *Lb. sakei* strains, and Héquet *et al.* (2007) characterized a bacteriocinogenic strain isolated from a meat environment, *Lb. curvatus* 2711, which produces SakX and potentially SakT, but not SakP, even though it harbours the corresponding structural gene (*sppA*) (Moretro *et al.*, 2005). Similarly, *Lb. curvatus* LTH1174 and *Lb. curvatus* L442, both isolated from naturally-fermented sausages, are able to produce CurA, SakP and SakQ, and SakP and SakQ, respectively (Cocolin and Rantsiou, 2007).

Class IIa bacteriocins exert a strong inhibitory activity against *Listeria* spp. (Ennahar *et al.*, 2000; van Belkum and Stiles, 2000; Drider *et al.*, 2006), and thus have been the focus of increased attention due to their potential application as antilisterial agents in food preservation (Eijsink *et al.*, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002; Rihakova *et al.*, 2009). *Listeria monocytogenes* emerged as an important food-borne pathogen in the latter part of the 20th century. This ubiquitous microorganism occurs widely in agricultural (*e.g.*, soil, vegetation, silage, faecal matter, sewage and water), aquacultural, and food processing environments, as it might be present in almost all food raw materials. Furthermore, it may also be present in cooked foods due to improper food handling after processing (FAO, 2004; CAC, 2007). *L. monocytogenes* is a Gram-positive, facultatively anaerobic, and non-spore forming rod. It is catalase positive and oxidase negative, and, amongst other toxins, secretes a β -hemolysin which produces zones of clearing on blood agar. The microorganism possesses peritrichous flagella, which give it a characteristic tumbling motility, occurring only in a narrow temperature range (20–25°C). *L. monocytogenes* is psychrotrophic and grows over a temperature range of 0 to 50°C, with an optimum between 30 and 37°C. It can grow at pH levels between 4.3 and 9.4 and water activities ≥ 0.92 , and resists high NaCl concentrations (25.5%) (Farber and Peterkin, 1991; FAO, 2004; Miettinen, 2006). *L. monocytogenes* can be classified into a number of subtypes using several methods, being the most common those based upon antigen recognition at the bacterial surface by specific antisera (Graves *et al.*, 1999). To date, thirteen *L. monocytogenes* serotypes have been identified (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e and 7), being all of them associated to pathogenicity. However, most human food-borne listeriosis cases and outbreaks are associated with a restricted number of serotypes, namely 1/2a, 1/2b and 4b (Rocourt *et al.*, 2000; FDA/FSIS, 2003; FAO, 2004; Miettinen, 2006). The disease caused by this bacterium, referred to as listeriosis, is acquired by ingesting contaminated food products and may constitute a serious invasive process, particularly in certain well-defined high-risk groups, including the elderly, immunocompromised patients, pregnant women, newborns and infants (WHO, 1988; Rocourt *et al.*, 2000, 2001; FAO, 2004; Hamon *et al.*, 2006; Cossart, 2007). Listeriosis is one of the most severe food-borne infections, with low morbidity but high mortality rate (*ca.*, 30%) (Rocourt *et al.*, 2001), and infections have been associated with a variety of foods, including milk, cheese, meat, fish, and vegetables (Davies *et al.*, 1984; Tham *et al.*, 2000; de Valk *et al.*, 2001; Lunden *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2005). The impact of listeriosis in public health is not always recognized, particularly

because it is a relatively rare disease compared with other food-borne illnesses such as salmonellosis, campylobacteriosis and botulism (FAO, 2004; Miettinen, 2006; Bortolussi, 2008). The severity of the disease and the very frequent involvement of industrially processed foods, especially during outbreaks, mean that the social and economic impact of listeriosis is amongst the highest of the food-borne diseases (Rocourt *et al.*, 2001; FDA/FSIS, 2003; FAO, 2004). Listeriosis is mainly observed in industrialized countries, and it is not known whether the differences in incidence rates between developed and developing countries reflect true geographical differences, different food habits and food storage conditions, or differences in diagnosis and reporting practices (FAO, 2004). During the last decade, extensive work has been performed in many countries to prevent outbreaks and decrease the incidence of listeriosis, which has promoted numerous studies regarding the control of *L. monocytogenes* in foods, particularly in those that pose a higher degree of risk.

Despite the fact that a wide variety of foods may be contaminated with *L. monocytogenes*, most sporadic cases and all large outbreaks of human listeriosis appear to be predominantly associated with ready-to-eat (RTE) products (FDA/FSIS, 2003; FAO, 2004). RTE products include a large and heterogeneous category of foods with an extended shelf life at refrigerated temperatures (CAC, 1999), capable of supporting the growth of *L. monocytogenes* and consumed without any listericidal treatment (Rocourt, 1996; Nørrung *et al.*, 1999; FDA/FSIS, 2003; FAO, 2004; Miettinen, 2006). RTE foods also include products that receive a listericidal treatment but are subject to post-processing or cross-contamination in both the retail and home setting (Rocourt, 1996; FAO, 2004). Different types of seafood, particularly slightly preserved products such as smoked fish products (hot and cold smoked), slightly salted products and marinated products, fall within this category. In fact, outbreaks of listeriosis associated with the consumption of fresh seafood, smoked salmon, smoked mussels, smoked trout and raw oysters have been frequently reported (Ericsson *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1998; Jørgensen and Huss, 1998; Autio *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1999; Huss *et al.*, 2000; Rørvik, 2000; Miettinen, 2006). Over the last two decades, scientists, regulators and food processors have striven to control *L. monocytogenes* in such food products. For these reasons, biopreservation technology, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety using microorganisms and/or their metabolites (Ross *et al.*, 2002), has gained special attention for its application in minimally processed seafood, such as cold-smoked salmon, for the control of pathogens such as *L. monocytogenes*. In this context, it should be mentioned that the development of biopreservation strategies for fish and fish products requires the identification of suitable LAB strains, which should be preferably isolated amongst the LAB microbiota found in fresh fish and its processing environments, since strains already acclimatized to a seafood habitat would be advantageous in terms of biopreservation of these products (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009).

During the last two decades, several studies have been focused on the isolation and characterization of LAB with antimicrobial activity against food-spoilage and pathogenic bacteria that may be used as food biopreservatives (Vogel *et al.*, 1993; Cintas *et al.*, 1995; Hugas *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1998b; Duffes *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2001; Katla *et al.*, 2001; Benkerroum *et al.*, 2005; Katikou *et al.*, 2005; Castellano and Vignolo, 2006;

Ghalfi *et al.*, 2006; Dortu *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2011). With regard to this, in a previous work (Chapter III), we evaluated the antimicrobial spectrum of 25 bacteriocinogenic LAB strains (20 *Enterococcus faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. and 1 *Pediococcus pentosaceus*) isolated from fish, seafood and fish products. The four *Lactobacillus* spp. strains isolated from cockle (*Cerastoderma edule*) (*Lb. sakei* subsp. *sakei* B11), cold-smoked and marinated Atlantic salmon (*Salmo salar*) (*Lb. sakei* subsp. *carneus* SMA17 and *Lb. sakei* subsp. *carneus* SMM73, respectively), and dry-salted cod (*Gadus morhua*) (*Lb. curvatus* subsp. *curvatus* BCS35), were selected for further characterization. Amongst these strains, *Lb. curvatus* BCS35 stands out because of its broad and strong antimicrobial spectrum against the food-borne pathogen *L. monocytogenes* and several fish spoilage and pathogenic bacteria, such as *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola* and *Shewanella putrefaciens*. In this chapter, we describe the biochemical and genetic characterization of the bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, and compare, under the same stated experimental conditions, the specific antimicrobial activity of these bacteriocins purified to homogeneity and two previously characterized anti-*Listeria* class IIa bacteriocins, SakP and PedPA-1, against several *Listeria* spp. and LAB strains. Finally, the *in vitro* safety assessment of *Lb. curvatus* BCS35 under the QPS approach proposed by EFSA (2007) was carried out in order to explore the biotechnological potential of this multibacteriocinogenic strain as fish biopreservative.

IV.3. MATERIALS AND METHODS

IV.3.1. Bacterial strains and culture conditions

Bacteriocinogenic and indicator strains used in this study are shown in Table IV.1. The bacteriocin producers *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73, and *Lb. curvatus* BCS35 were previously isolated from fish, seafood and fish products using the methodology described by Cintas *et al.* (1995), and identified by comparing its whole-cell protein profile with that of LAB previously described at University of Ghent (BCCM/LMG Culture Collection, Ghent, Belgium) (Chapter III). LAB cultures were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 30°C. *Listeria* spp. were propagated aerobically in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid) at 32°C. .

IV. 3.2. PCR detection of CurA, SakP and SakQ structural genes in *Lactobacillus* spp. strains

For PCR amplification of CurA (*curA*), SakP (*sppA*), and SakQ (*sppQ*) structural genes in *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73, and *Lb. curvatus* BCS35, specific primers were designed based on the DNA sequence of CurA (Tichaczek *et al.* 1993), SakP (Eijsink *et al.* 1996), and SakQ (Cocolin and Rantsiou, 2007) structural genes (Genbank accession number S67323, AF00227, and DQ019416, respectively) (Table IV.2). Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). *Lb. sakei* Lb706 and *Lb. sakei* LTH673 were used as positive controls for PCR amplification of *curA*, and *sppA* and *sppQ*, respectively. Total DNA from *Lactobacillus* spp.

Table IV.1. Bacteriocinogenic and indicator microorganisms used in this study.

Microorganisms	Strain	Bacteriocin(s) produced; Hly, Gel and Prt phenotype, or strain serotype ^a	Source ^b or reference
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	BCS35	Curvacin G14 (CurG14), curvacin G15 (CurG15), sakacin T (SakT [SakT _α and SakT _β]) and sakacin Q (SakQ)	This study
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	B11	Nd	This study
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	SMA17	Nd	This study
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	SMM73	Nd	This study
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	LTH673	Sakacin P (SakP) and SakQ	Tichaczek <i>et al.</i> (1992), Mathiesen <i>et al.</i> (2005)
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	Lb706	Sakacin A (SakA)	Holck <i>et al.</i> (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	347	Pediocin PA-1 (PedPA-1), Hly ⁻ , Gel ⁻ , Prt ⁻	Moreira (1993), Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FBB61	Pediocin A (PedA)	TNO
<i>P. pentosaceus</i>	FBB63	Nd	TNO
<i>Enterococcus faecium</i>	L50	Enterocin L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B]), enterocin P (EntP) and enterocin Q (EntQ)	Cintas <i>et al.</i> (1995, 1998a, 2000)
<i>E. faecium</i>	P13	EntP	Cintas <i>et al.</i> (1997)
<i>Enterococcus faecalis</i>	pAD1	Hly ⁺	Gilmore <i>et al.</i> (1994)
<i>E. faecalis</i>	P4	Gel ⁺ , Prt ⁺	Eaton and Gasson (2001)
<i>Listeria monocytogenes</i>	911	1/2c	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	932	1a	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	935	4b	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	936	1/2b	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	4031 ^T	1a	CECT
<i>L. monocytogenes</i>	4032	4b	CECT
<i>Listeria ivanovii</i>	913 ^T	5	CECT
<i>Listeria grayi</i>	931 ^T	Nd	CECT

^aNd, Not determined; Hly, hemolysin phenotype; Gel, gelatinase phenotype; Prt, protease phenotype. ^bAbbreviations: TNO, Nutrition and Food Research, Zeist (The Netherlands); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia (Spain).

strains was purified with the Wizard Genomic DNA Purification Kit as recommended by the manufacturer (Promega Corp., Madison, WI, USA). PCR amplifications were performed in 50 µl mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, 2mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), and 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). PCR reactions without template DNA were set up as negative controls. PCR mixtures were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 sec), annealing (at an appropriate temperature for 30 sec), and elongation (72°C for 30 to 60 sec), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in a Techgene DNA thermal cycler (Techne, Cambridge,

UK). The amplified PCR products were resolved by electrophoresis through 1-2% (wt/vol) agarose gels at 60-70 V/cm for 60-80 min, using the 100 pb DNA ladder (Invitrogen) as molecular weight marker, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories S. A., Madrid, Spain) used for image acquisition and computer analysis.

Table IV.2. Oligonucleotide primers used for PCR and/or DNA sequencing.

Primer pairs	Nucleotide sequence (5'→3') ^a	Comments	Source and/or reference ^b
Curvacin A			
CurA1	ATGAATAATGTAAAAGAATTAAGTATGAC	Specific primers	This study/ (Tichaczek <i>et al.</i> , 1993)
CurA2	GCTAGATCATATGGCAACGGTG		
CurA3	CATTCCAGCTAAACCACTAGCC		
Sakacin P			
SakP1	ATGGAAAAGTTTATTGAATTATC	Specific primers	This study/ (Eijsink <i>et al.</i> , 1996)
SakP2	AAATATTATGGTAACGGTGTAC		
SakP3	TTATTCCAGCCAGCGTTTC		
Curvacin G14			
CurG14PF1	GGCAATACAATCAGAAGAGATAGG	Specific primers	This study
CurG14PR2	CCACAGTGTAACCGTTACCATA		
CurG14PF3	TGTTGCTAGATCTGAACCATGATC		
CurG14PR4	GATCATGGTTCAGATCTAGCAACA		
Curvacin G15			
CurG15F1	GGWGGWAAATAYTAYGGWAAAYGG	Degenerate primers	This study
CurG15R2	CCRTTWCCRTARTATTTWCCWCC		
CurG15F3	ATTATTGGWAAAYAYGCGWTGCGWGA		
CurG15R4	TCWGCWACWGCRTTRTTWCCAATAAT		
CurG15TF5	CCCAATTATCGCTATAGAAGCAGT	Specific primer	
CurG15TR6	TGAACCAAGGTAGATGGTCGTTG	Specific primer	
Sakacin X			
SakXF1	GATGGTCGTTGAATACAATTTT	Specific primers	Vaughan <i>et al.</i> (2003)
SakXR2	TATACCAAACCACAGAAAATCGTC		
SakXF3	TTCTGGTGGAGTCGAAAGAGG		
SakXR4	CTTGTTACCTCTTTCTGACTCC		
Sakacin Q			
SakQF	ATGCAAAATACAAAAGAACTAA	Specific primer	Cocolin and Rantsiou (2007)
SakQR	CGCTTGTTTAGAGACACCCGTT		
pCR-Blunt II-TOPO sequencing vector			
T7	CCCTATAGTGAGTCGTATT	Specific primers of pCR-Blunt II-TOPO	Invitrogen
M13R	GTCATAGCTGTTTCCTG		

^aDegenerate code used for primer design: W, A or T; Y, C or T; R, A or G. ^bReferences in brackets refer to the source of the nucleotide sequence.

IV.3.3. Bacteriocin activity assays

The bacteriocin producing strains *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *Pediococcus acidilactici* 347 (Table IV.1) were grown in MRS broth at 30°C until the stationary phase. Cultures

were then centrifuged at $12,000 \times g$ at 4°C for 10 min, and the pH of their cell-free culture supernatants was adjusted to 6.2 with 1M NaOH. The supernatants were further filter-sterilized through $0.22 \mu\text{m}$ -pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) and stored at -20°C until further use. The bacteriocin activity of supernatants was determined by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995) as previously described (Chapter III), and a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000). In the ADT, after incubation, the antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells. Briefly, in the MPA, two-fold serial dilutions of supernatants (50 μl ; in MRS or BHI broth) or purified bacteriocins (5 μl ; in MRS or BHI broth) were prepared in microtiter plates. The wells were filled up to 200 μl by the addition of 150 μl of a diluted (in MRS or BHI broth) fresh overnight culture of the indicator microorganism (*ca.*, 1×10^5 cfu/ml). Growth inhibition of *Listeria* spp. and LAB strains was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland) after incubation at 30°C for 12 and 16 h, respectively. One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of supernatant or purified bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

In order to determine their maximum bacteriocin activity, *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 (*ca.*, 2×10^5 cfu/ml) were grown in MRS broth at 30°C under aerobic conditions for 18 h. Supernatants were obtained at 12, 14, 16 and 18 h as described above. Bacterial growth (A_{600}), pH and bacteriocin activity of supernatants were determined periodically in duplicate. For determination of bacteriocin activity, the supernatants were assayed by an ADT and an MPA using *L. monocytogenes* CECT4032 and *P. pentosaceus* FBB63 as indicator microorganisms. To compare the extracellular antimicrobial activity of the three bacteriocinogenic strains, the supernatants showing the highest bacteriocin activity were challenged against 8 *Listeria* spp. and 8 LAB strains (Table IV.1) by an MPA.

The specific antimicrobial activity of purified curvacin G14 (CurG14) and curvacin G15 (CurG15) produced by *Lb. curvatus* BCS35, SakP produced by *Lb. sakei* LTH673, and pediocin PA-1 (PedPA-1) produced by *P. acidilactici* 347 against 8 *Listeria* spp. and 8 LAB strains (Table IV.1) was determined by an MPA. The concentration of purified bacteriocins was determined by measuring their UV absorption at 280 (A_{280}), and the values were converted to protein concentrations by using the molar extinction coefficients calculated from the contribution of individual amino acid residues.

IV.3.4. Bacteriocin purification, mass spectrometry and amino acid sequencing

Bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 were purified by using a modification of the method previously described by Casaus *et al.* (1997). Briefly, LAB precultures were inoculated (*ca.*, 1×10^5 cfu/ml) in 1-liter MRS broth, and further grown at 30°C under aerobic conditions until maximum bacteriocin concentrations were achieved (*ca.*, 18, 16 and 16 h, respectively). All the chromatographic equipment was obtained from GE Life Sciences (Barcelona, Spain). After removing the cells by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 30 min), the supernatants

were subjected to precipitation with ammonium sulphate (50%, wt/vol) (Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain), and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns). The obtained fractions were further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reversed-phase (RP) chromatography (PepRPC HR 5/5) in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC). The bacteriocins were eluted from the RP-column with a linear gradient of 2-propanol (Merck) in aqueous 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) (Merck) at a flow rate of 0.5 ml/min. The bacteriocin activity of the fractions obtained during the purification process was determined by an MPA using *L. monocytogenes* CECT4032 and *P. pentosaceus* FBB63 as indicator microorganisms. Fractions displaying a high and specific bacteriocin activity were pulled together and rechromatographed on the same RP-column until chromatographically pure bacteriocins were obtained. The purified bacteriocins were stored in 2-propanol (Merck) containing 0.1% (vol/vol) TFA (2-propanol-TFA) at -20°C . Fractions from the last RP-FPLC step were subjected to mass spectrometry analysis by using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Mass Spectrum Service of the Centro de Genómica y Proteómica (Madrid, Spain).

The purified fraction containing curvacin G15 (CurG15) obtained from *Lb. curvatus* BCS35 was subjected to N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation using a 477A automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an on-line 120A phenylthiohydantoin amino acid analyser, at the Department of Biochemistry, University of Oslo (Oslo, Norway).

IV.3.5. Nucleotide sequencing

For DNA sequencing, total DNA from *Lb. curvatus* BCS35 was purified as described above. Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), DNA restriction enzymes (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA), calf alkaline phosphatase (Promega), T4 DNA ligase (Promega) and Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) were used according to the supplier's instructions. The nucleotide sequence of CurG14 (*curG14*) and SakQ (*sppQ*) structural genes was determined by sequencing the PCR products obtained with *sppA* and *sppQ* specific primers, respectively (Table IV.2). To determine the nucleotide sequence of CurG15, degenerate primers (Table IV.2) were deduced from the partial amino acid sequence obtained by Edman degradation. Different DNA samples from *Lb. curvatus* BCS35 were digested with the blunt-end restriction enzymes *DraI*, *EcoRV*, *HincIII*, *PvuI*, *ScaI* and *SmaI*, and ligated to the *EcoRV*-digested pCR-Blunt II-TOPO sequencing vector (Invitrogen Life Technologies, Oslo, Norway). These ligation mixtures were used as DNA templates in PCR reactions which were carried out using a vector-specific primer combined with a degenerate primer deduced from the partial amino acid sequence of the purified CurG15. To obtain the partial nucleotide sequence of the CurG14 and CurG15 gene clusters, PCR reactions were successively performed using the ligation mixtures described above in

combination with a vector-specific primer and specific primers based on the newly obtained nucleotide sequences.

The PCR-generated fragments were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Nucleotide sequencing of both strands of purified PCR products was performed by the dideoxy chain terminating method (Sanger *et al.*, 1977), using an ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq DNA polymerase and dye-labeled terminators, and an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA). A search for homology of the DNA sequences was carried out using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997) available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, USA) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

IV.3.6. *In vitro* safety evaluation of *Lb. curvatus* BCS35

Minimum inhibitory concentrations (MICs) for *Lb. curvatus* BCS35 were determined by a broth microdilution test (Klare *et al.*, 2005). Briefly, individual colonies grown on MRS agar (1.5%, wt/vol) at 30°C for 24 h were suspended in 5 ml of saline solution (0.85% NaCl, wt/vol) to a turbidity of 1 in the McFarland scale (approx., 3×10^8 cfu/ml), and further diluted 1000-fold. Fifty or 100 µl of the diluted bacterial suspensions was added to each microplate well containing two-fold serial dilutions of each antibiotic, and incubated anaerobically at 30°C for 18 h. The antibiotics tested (Sigma-Aldrich Corporation., St. Louis, MO, USA) were (test ranges in µg/ml): ampicillin (0.125 to 128), vancomycin (0.125 to 128), erythromycin (0.125 to 128), azithromycin (0.5 to 512), clarithromycin (0.5 to 512), quinupristin+dalfopristin (0.5 to 512), tetracycline (0.125 to 128), chloramphenicol (0.125 to 128), kanamycin (0.5 to 512), gentamycin (0.5 to 512), streptomycin (0.5 to 512), rifampicin (0.5 to 512), nalidixic acid (0.5 to 512), and levofloxacin (0.125 to 128). After incubation, MICs were established as the lowest concentration of the antimicrobial agent that inhibited bacterial growth, and interpreted according to the breakpoints identified by the FEEDAP Panel and adopted by EFSA to distinguish between susceptible and resistant strains (EFSA, 2008, 2011, 2012). Accordingly, strains showing MICs higher than the respective breakpoint were considered as resistant.

In order to investigate hemolysin and gelatinase production, and protease activity in *Lb. curvatus* BCS35, assays were performed as previously described (Chapter III), using *E. faecalis* pAD1 and *P. acidilactici* 347 as positive and negative controls for β-hemolysis, respectively, and *E. faecalis* P4 and *P. acidilactici* 347 as positive and negative controls, respectively, for gelatinase and protease activity.

IV.4. RESULTS

IV.4.1. PCR detection of *curA*, *sppA* and *sppQ* in *Lactobacillus* spp.

To determine the presence of structural genes encoding previously described sakacins in *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 and *Lb. curvatus* BCS35, total DNA from these strains was

evaluated for the PCR amplification of *curA*, *sppA* and *sppQ* using specific primers (Table IV.2). *Lb. curvatus* BCS35 was the only strain that amplified 128- and 182-bp fragments corresponding to *sppA* (Fig. 4.1, panels A and B), and a 196-bp fragment of *sppQ* (Fig. 4.1, panel C). None of the *Lactobacillus* spp. strains tested allowed the amplification of the 176- and 122-bp fragments encoding *curA* (Fig. 4.1, panels D and E).

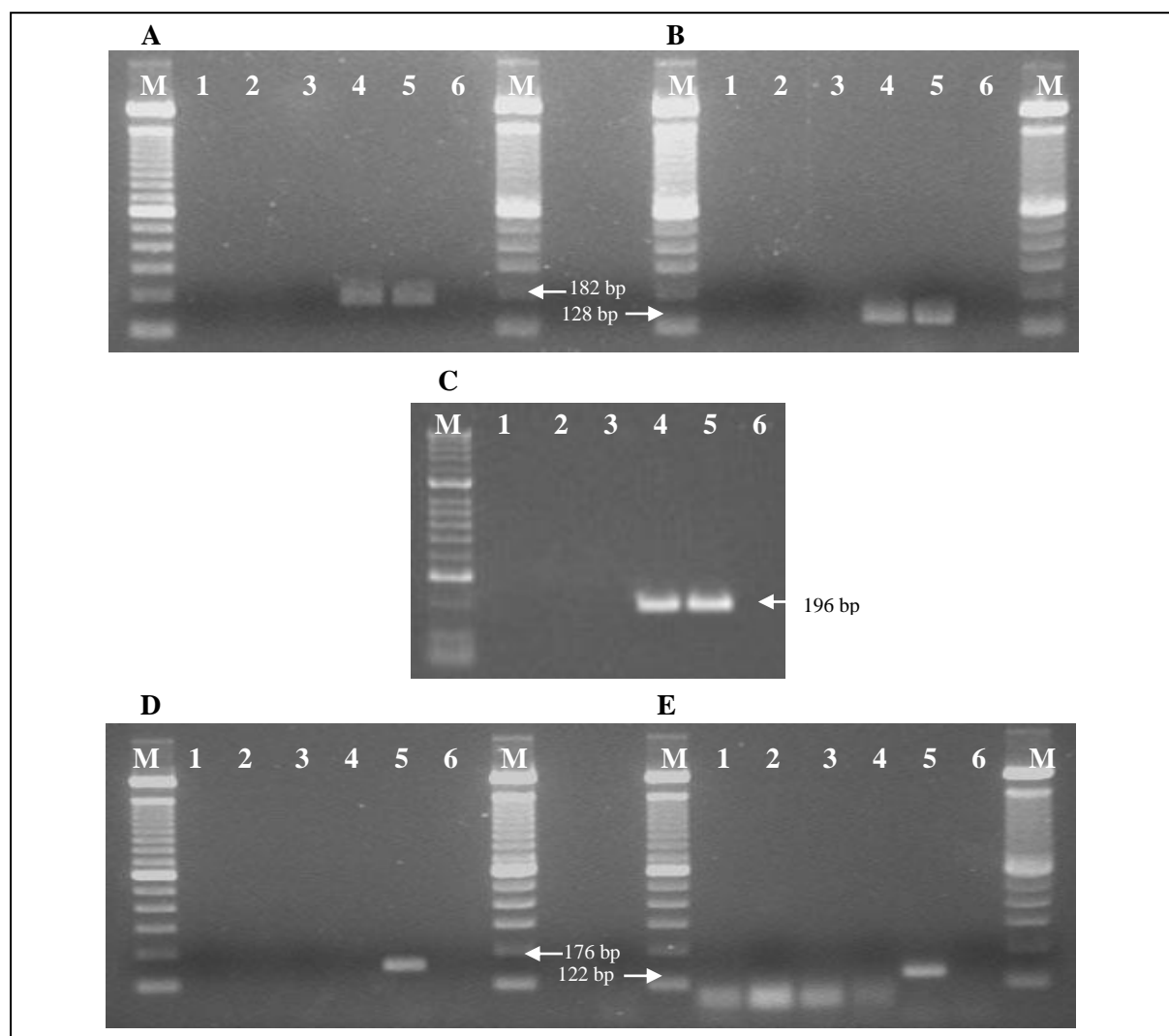


Figure 4.1. PCR detection of *sppA* with primers pairs SakP1-SakP3 (A) and SakP2-SakP3 (B), *sppQ* with primers pairs SakQF-SakQR (C), and *curA* with primers pairs CurA1-CurA3 (D) and CurA2-CurA3 (E) in *Lactobacillus* spp. strains of marine origin. A, B and C: lanes 1-6, test reactions using genomic DNA from *Lb. sakei* B11 (1), *Lb. sakei* SMA17 (2), *Lb. sakei* SMM73 (3), *Lb. curvatus* BCS35 (4), *Lb. sakei* LTH673 (positive control) (5), and negative control reaction without DNA template (6); D and E: lanes 1-6, test reactions using genomic DNA from *Lb. sakei* B11 (1), *Lb. sakei* SMA17 (2), *Lb. sakei* SMM73 (3), *Lb. curvatus* BCS35 (4), *Lb. sakei* Lb706 (positive control) (5), and negative control reaction without DNA template (6); M, 100-bp DNA ladder (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA).

IV.4.2. Comparative extracellular antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347

Bacterial growth (A_{600}), pH and bacteriocin activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 cultures grown in MRS broth were determined. The initial pH of the medium (6.2) dropped gradually to 4.2–4.6 at the end of the incubation period, and all the strains reached an A_{600} of 1–1.1 after incubation for 18 h (results not shown). The antimicrobial activity of cell-free culture supernatants from cultures grown for 12, 14, 16 and 18 h was tested against *L. monocytogenes* CECT4032 and *P. pentosaceus* FBB63 by an MPA and an ADT (Table IV.3). The maximum antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 against *L. monocytogenes* CECT4032 was observed at 18, 14 and 14 h, respectively, while their maximum antimicrobial activity against *P. pentosaceus* FBB63 was obtained at 16, between 14 and 16, and 18 h, respectively.

Table IV.3. Extracellular antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 at different growth times.

Indicator microorganism/ Growth time (h)	<i>Lb. curvatus</i> BCS35			<i>Lb. sakei</i> LTH673			<i>P. acidilactici</i> 347		
	MPA ^a (BU/ml)	ADT ^b		MPA (BU/ml)	ADT		MPA (BU/ml)	ADT	
		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)
<i>L. monocytogenes</i> CECT4032									
12	202,590	26.2 s2	10,201	47,765	17.4 s	4,207	11,816	21.6 s2	6,743
14	197,300	24.2 s2	8,634	56,151	19.9 s	5,668	13,065	22.2 s2	7,176
16	242,396	25.2 s2	9,410	54,300	17.8 s	4,390	12,360	20.8 s2	6,243
18	256,000	25.6 s2	9,729	51,944	17.3 s	4,116	12,865	20.5 s2	6,029
<i>P. pentosaceus</i> FBB63									
12	315	14.4 s2	2,669	119	9.5 s-	853	4,935	19.8 s2	5,593
14	230	13.2 s2	2,171	169	10.7 s-	1,230	5,510	20.7 s2	6,191
16	310	14.7 s2	2,820	197	9.8 s-	952	5,285	20.8 s2	6,198
18	310	13.2 s2	2,184	185	10.2 s-	1,053	7,555	21.0 s2	6,362

^aAntimicrobial activity (BU/ml) of cell-free culture supernatants of cultures grown in MRS at 32°C as determined by an MPA. ^bAntimicrobial activity (mm) as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: s= slightly sharp, s= sharp and s2= very sharp.

The susceptibility of 8 *Listeria* spp. and 8 LAB strains to the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 showing the highest antimicrobial activity (Table IV.3) was determined by an MPA (Table IV.4). The supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 were significantly more active against all the tested indicator strains than those from the SakP producer *Lb. sakei* LTH673. The average of the antimicrobial activity ratio of supernatants from BCS35/LTH673 against *Listeria* spp. was greater than 628 times, while the average against LAB species was 176 times. However, when comparing the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 with those from the PedPA-1 producer, the formers were more active (on average, >17 times) against 5 out of 8 *Listeria* spp. (including 3 strains of *L. monocytogenes*), but showed significantly less (on average, 0.026 times) antimicrobial activity against LAB strains.

Table IV.4. Extracellular antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 against *Listeria* spp. and LAB strains.

Indicator microorganisms ^a	Antimicrobial activity (BU/ml) ^b			Antimicrobial activity ratio ^c	
	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	<i>Lb. sakei</i> LTH673	<i>P. acidilactici</i> 347	BCS35/LTH673	BCS35/347
Listeria spp. strains					
<i>L. monocytogenes</i> CECT911	4,023	0	8,175	4,023	0.49
<i>L. monocytogenes</i> CECT932	6,400	378	6,400	17	1
<i>L. monocytogenes</i> CECT935	> 409,600	1,490	25,600	> 275	> 16
<i>L. monocytogenes</i> CECT936	> 409,600	2,477	51,200	> 165	> 8
<i>L. monocytogenes</i> CECT4031	19,718	2,137	20,760	9	0.95
<i>L. monocytogenes</i> CECT4032	> 409,600	1,434	10,923	> 286	> 38
<i>L. ivanovii</i> CECT913	> 409,600	4,264	138,503	> 96	> 3
<i>L. grayi</i> CECT931	> 409,600	2,655	17,488	> 154	> 23
LAB strains					
<i>P. pentosaceus</i> FBB61	70	0	1,867	70	0.04
<i>P. pentosaceus</i> FBB63	245	172	13,624	1	0.02
<i>Lb. sakei</i> Lb706	229	0	140	229	2
<i>E. faecium</i> L50	248	0	7,206	248	0.03
<i>E. faecium</i> P13	507	155	31,294	3	0.02
<i>Lb. curvatus</i> BCS35	0	0	0	-	-
<i>Lb. sakei</i> LTH673	263	0	Nd	263	Nd
<i>P. acidilactici</i> 347	0	Nd	0	Nd	-

^aFor indicator strains see Table IV.1. ^bAntimicrobial activity (BU/ml) of cell-free culture supernatants, as determined by an MPA. Nd, not determined. ^cRatio determined by dividing the extracellular antimicrobial activity of strain X by that of strain Y.

IV.4.3. Purification and mass spectrometry of CurG14 and CurG15, SakP and PedPA-1 from *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347, respectively, and amino acid sequencing of CurG15

Lb. curvatus BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 were grown in 1-liter MRS broth at 30°C until maximum bacteriocin activity was achieved according to data shown in Table IV.3 (ca., 18, 14 and 14 h, respectively). Ammonium sulphate precipitation of proteins in culture supernatants allowed an increase in specific antimicrobial activity of 9-, 1- and 3-fold, respectively, and a recovery of 92, 129 and 43%, respectively, of the bacteriocin activity originally present in culture supernatants (Table IV.5).

Fractions from the ammonium sulphate precipitation step were desalted by gel filtration prior to cation-exchange chromatography, resulting in fractions with 44, 67 and 37% of the initial antimicrobial activity found in the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347, respectively. The fractions eluted from the hydrophobic-interaction column showed a recovery of 62, 7 and 83% of the initial antimicrobial activity and a 7,162; 873 and 5,342-fold increase in specific antimicrobial activity, respectively. The last RP-FPLC purification step for *Lb. curvatus* BCS35 resulted in 2 well-separated absorbance peaks that coincided with fractions with antimicrobial activity, termed fractions A and B. Fractions A and B eluted at 23 and 29% (vol/vol) 2-propanol-TFA, respectively, and their final specific activity was 22,420 and 30,343-fold greater than that of the culture supernatant, representing a recovery of 11 and 19%, respectively, of the initial antimicrobial activity. The purity and molecular mass of the bacteriocins contained in fractions A and B were evaluated by

MALDI-TOF MS (Fig. 4.2, A and B). The results indicated that the antimicrobial activity exerted by *Lb. curvatus* BCS35 is due to the production of, at least, two bacteriocins termed curvacin G14 (CurG14), corresponding to fraction A, and curvacin G15 (CurG15), corresponding to fraction B, with a molecular mass of 4,460.97 and 4,362.65 Da, respectively (Fig. 4.2, A and B). The purity and molecular mass of SakP and PedPA-1 obtained from *Lb. sakei* LTH673 and *P. acidilactici* 347 cultures, respectively, were also confirmed by MALDI-TOF MS, revealing in both cases a single peptide with the expected molecular mass (4,435.14 and 4,624.52 Da, respectively) (Fig. 4.2, C and D).

Edman degradation analysis of purified CurG15 from *Lb. curvatus* BCS35 revealed the following N-terminal amino acid sequence: KYYGNGLSXNKSXSVDSKASISIIIGNNAVADLTG (Table VI.6), where the X at positions 9 and 14 indicate blank cycles in which no amino acid derivatives were detected. At these positions, cysteine (Cys) residues forming a disulfide bond were expected, so these blank degradation cycles were not surprising as disulfide-linked Cys residues do not give any signal in an Edman sequencer (Cys is not derivatized by Edman degradation). According to this result, CurG15 is identical to SakX, a class IIa bacteriocin previously identified in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), except for the presence of an aspartate (D) instead of an asparagine (N) at position 32 (Table IV.6).

Table IV.5. Purification of CurG14 and CurG15 produced by *Lb. curvatus* BCS35, SakP produced by *Lb. sakei* LTH673, and PedPA-1 produced by *P. acidilactici* 347.

Purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total antimicrobial activity (10 ³ BU) ^b	Specific antimicrobial activity (BU/A ₂₅₄) ^c	Increase in specific antimicrobial activity (fold) ^d	Total antimicrobial activity (%)
<i>Lb. curvatus</i> BCS35						
Culture supernatant	1,000	56,900	235	4	1	100
Ammonium sulfate precipitation	100	6,220	217	35	9	92
Gel filtration chromatography	200	2,900	189	65	16	80
Cation-exchange chromatography	50	120	102	853	213	44
Hydrophobic-interaction chromatography	10	5.1	146	28,647	7,162	62
Reversed-phase chromatography						
Fraction A	0.850	0.281	25	89,680	22,420	11
Fraction B	1.200	0.365	44	121,370	30,343	19
<i>Lb. sakei</i> LTH673						
Culture supernatant	1,000	27,600	153	6	1	100
Ammonium sulfate precipitation	100	28,700	198	7	1	129
Gel filtration chromatography	200	920	104	113	19	68
Cation-exchange chromatography	50	0.5	103	206,000	34,333	67
Hydrophobic-interaction chromatography	10	2.1	11	5,238	873	7
Reversed-phase chromatography						
Fraction A	0.600	0.037	3	81,081	13,514	2
<i>P. acidilactici</i> 347						
Culture supernatant	1,000	19,300	7,900	409	1	100
Ammonium sulfate precipitation	100	2,740	3,401	1,241	3	43
Gel filtration chromatography	200	1,860	2,945	1,583	4	37
Cation-exchange chromatography	50	20	2,939	146,950	359	37
Hydrophobic-interaction chromatography	10	3	6,554	2,184,667	5,342	83
Reversed-phase chromatography						
Fraction A	0.450	0.238	8,906	37,420,168	91,492	113

^aAbsorbance at 254 nm (A₂₅₄) multiplied by the volume in milliliters. ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters. ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total antimicrobial activity (BU) divided by the total A₂₅₄. ^dThe specific antimicrobial activity of a fraction (BU/A₂₅₄) divided by the specific antimicrobial activity of the culture supernatant (BU/A₂₅₄).

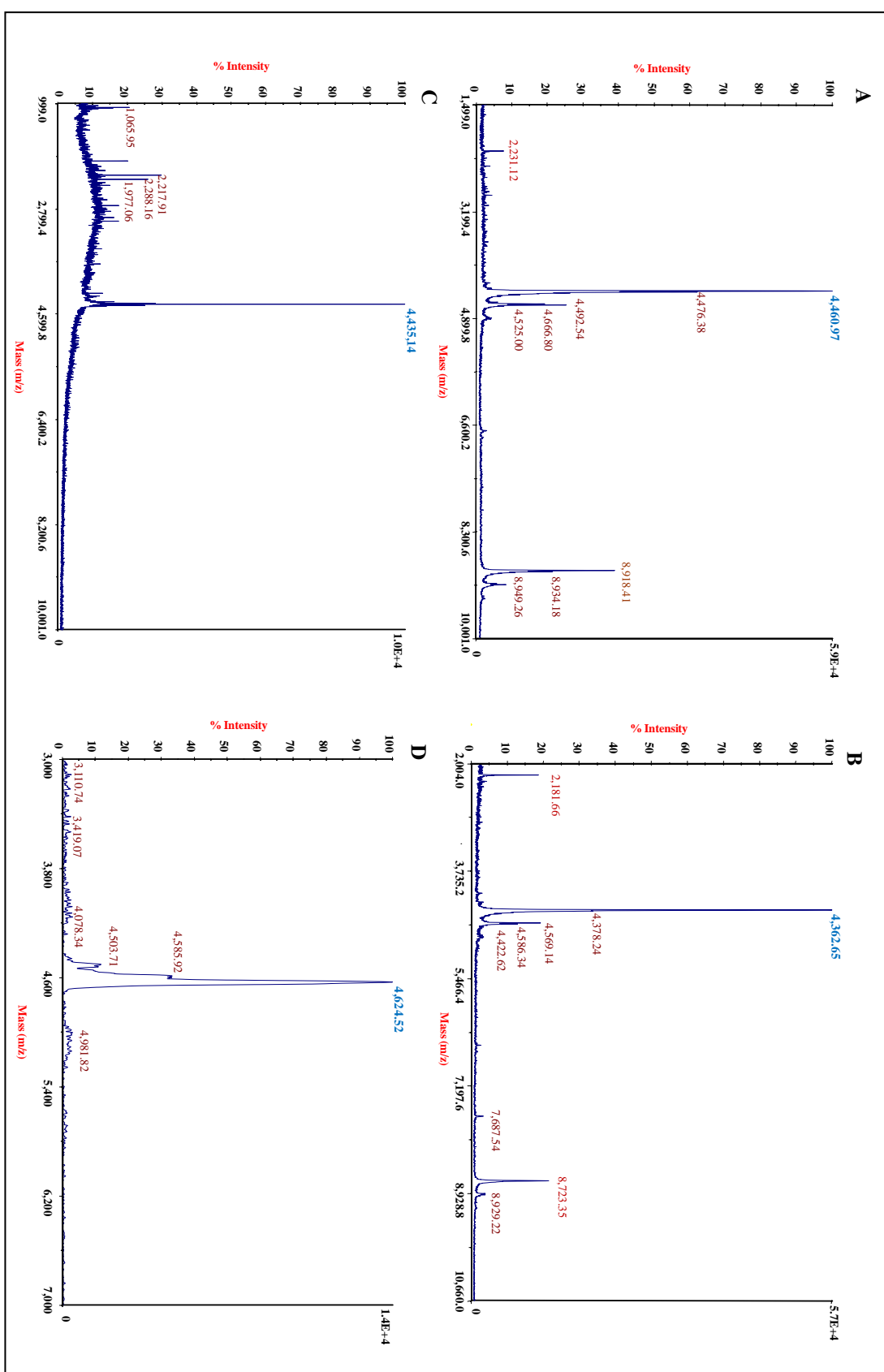


Figure 4.2. Mass spectrometry analysis of purified CurG14 (SakP variant) (A) and CurG15 (SakX) (B) from *Lb. curvatus* BCS35, SakP from *Lb. sakei* LTH673 (C), and PedPA-1 from *P. acidilactici* 347 (D).

Table IV.6. Comparison of CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakT (SakTa and SakTp) and SakQ from *Lb. curvatus* BCS35 with other class II bacteriocins.

Bacteriocin	Amino acid sequence ^a										Molecular mass ^b	Producer microorganism	References ^c
	N-terminal extension		Mature bacteriocin										
	-20	-10	1	10	20	30	40	50					
Class IIa ^c													
PedPA-1			↓										
	M K K I E K L T E K E M A N I I G G	K Y Y G N G V T C	G K H S C S V D	W G K A T T C I I N N G A M A W A T G G H Q G N H K C					4,625.0	<i>P. acidilactici</i>	(1)		
CurG14 ^d	M E K F I E L S L K E V T A I T G G	K Y Y G N G V H C	G K Y S C T V D	W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K					4,461.0	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	(2)		
SakP variant	M E K F I E L S L K E V T A I T G G	K Y Y G N G V H C	G K Y S C T V D	W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K					Nd	<i>Lb. curvatus</i> L442	(3)		
	M E K F I E L S L K E V T A I T G G	K Y Y G N G V H C	G K Y S C T V D	W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K					Nd	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	(3)		
SakP	M E K F I E L S L K E V T A I T G G	K Y Y G N G V H C	G K H S C T V D	W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K					4,436.1	<i>Lb. sakei</i> 5	(4) (5)		
	M E K F I E L S L K E V T A I T G G	K Y Y G N G V H C	G K H S C T V D	W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K					4,435.0	<i>Lb. sakei</i> LTH673	(6)		
CurG15 ^e	M E A I K K L D L Q A M K G I V G G	K Y Y G N G L S X N K S G X S V D	W S K A I S I I G N N A V A D L T T G						4,362.7	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	(2)		
SakX	M E A I K K L D L Q A M K G I V G G	K Y Y G N G L S C N K S G C S V D	W S K A I S I I G N N A V A N L T T G G A A G W K S						4,365.1	<i>Lb. sakei</i> 5	(4) (5)		
Class IIb													
SakT													
SakT _a	M K N V Q S L S K E E L V L V V G G	Y T A K Q C L Q A I G S W G I A G T G A G A A G G P A G A	F V G A H V G G I A G S A V C I G G F L G Q						Nd	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	(2)		
	M K N V Q S L S K E E L V L V V G G	Y T A K Q C L Q A I G S W G I A G T G A G A A G G P A G A	F V G A H V G V I A G S A V C I G G F L G Q						4,647.3	<i>Lb. sakei</i> 5	(5)		
SakT _p	M K T A N I K L L T N Q E M I E I F G G	K T N W G S V V G S C V A G G L V G A L G G T P I S I G A	G C L V G A G Q D W I S Q K						Nd	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	(2)		
	M K T A N I K L L T N Q E M I E I F G G	K T N W G S V V G S C V A G G L V G A L G G T P I S I G A	G C L V G A G Q D W I S Q K						4,072.6	<i>Lb. sakei</i> 5	(4) (5)		
Class IIc													
SakQ ^f	M Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G	K R A S F G K C V V G - - -	A A G L G A G V S G G L W G M A A G G I G G E L A Y M G A N G C L						Nd	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	(2)		
	M Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G	K R A S F G K C V V G - - -	A A G L G A G V S G G L W G M A A G G I G G E L A Y M G A N G C L						Nd	<i>Lb. curvatus</i> L442	(3)		
	M Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G	K R A S F G K C V V G - - -	A A G L G A G V S G G L W G M A A G G I G G E L A Y M G A N G C L						Nd	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	(3)		
	M Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G	K R A S F G K C V V G - - -	A A G L G A G V S G G L W G M A A G G I G G E L A Y M G A N G C L						4,486.0	<i>Lb. sakei</i> LTH673	(7)		

^aThe arrow indicates the conserved preprolactocin cleavage site. The differences in the amino acid sequence are highlighted in red. ^bThe molecular mass of CurG14 and CurG15 was determined by mass spectrometry. ^cThe N-terminal conserved motif of class IIa bacteriocins (YNGNGVC) is underlined, cysteine residues (C) involved in disulfide bond formation are highlighted in blue, and central tryptophan residues (W) are highlighted in green. Charged residues of the mature bacteriocin are represented as blue boxes. ^dThe N-terminal amino acid sequence was deduced from the nucleotide sequence. ^eThe amino acid sequence shown above was obtained by Edman degradation, while that shown below was deduced from the nucleotide sequence. ^fThe five amino acid residues present in SakQ from *Lb. sakei* LTH673, but missing in SakQ from *Lb. curvatus* strains, are enclosed in a box. ^gReferences: (1) Marugg *et al.*, 1992; (2) This study; (3) Coccolin and Ramisou, 2007; (4) Vaughan *et al.*, 2001; (5) Vaughan *et al.*, 2003; (6) Tichaczek *et al.*, 1994; (7) Mathiesen *et al.*, 2005.

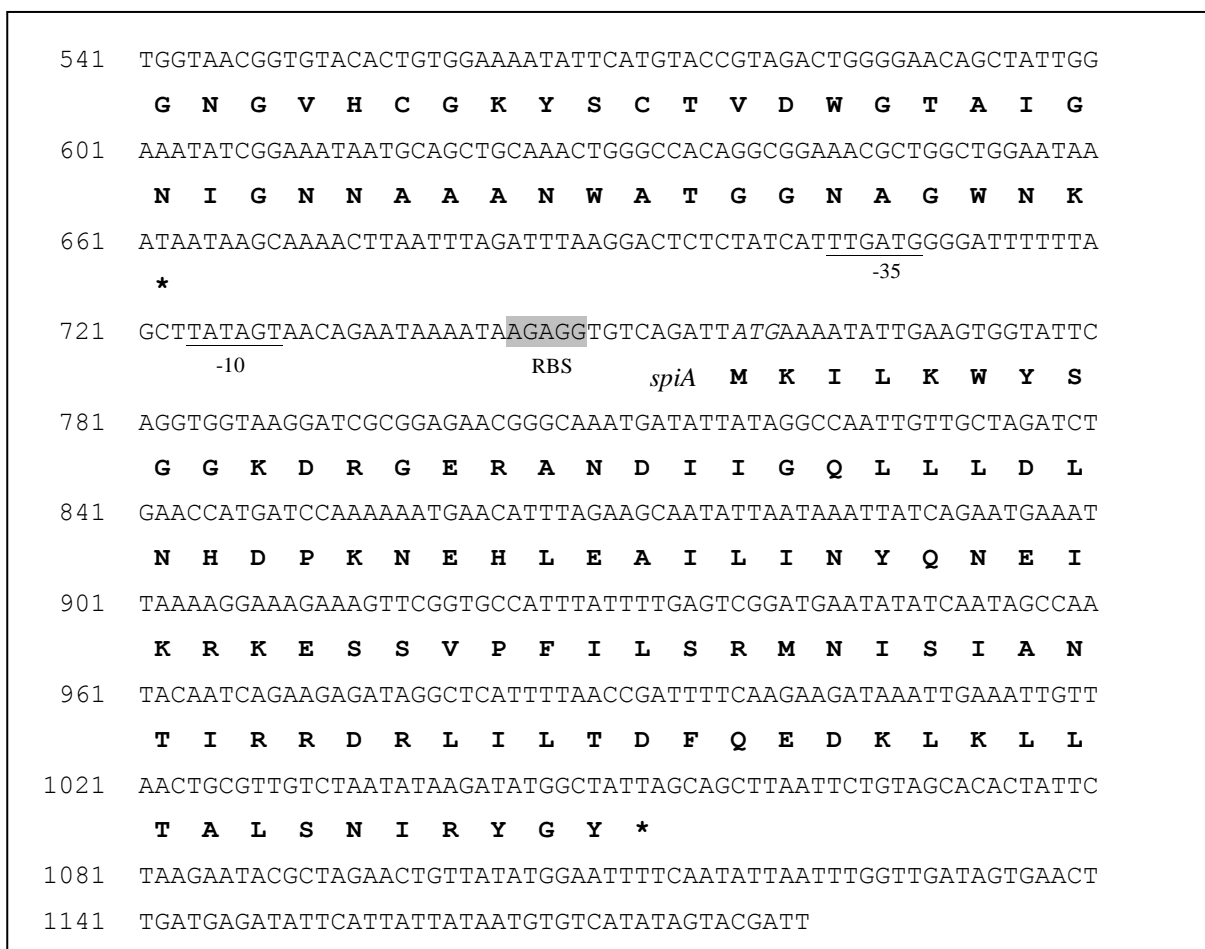


Figure 4.3. Continued.

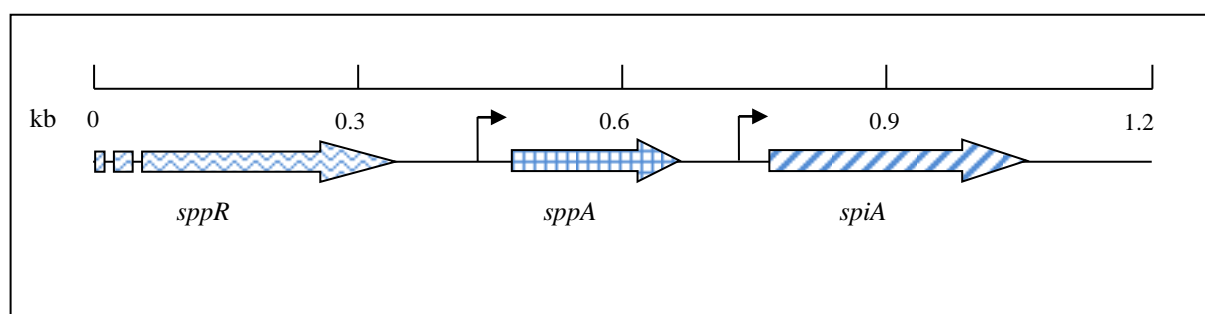


Figure 4.4. Genetic organization of the 1,182-bp nucleotide region from *Lb. curvatus* BCS35 containing curvacin G14 (SakP variant) structural (*sppA*) and immunity (*spiA*) genes, and a fragment of the gene encoding a response regulator protein (*sppR*). Putative –35 and –10 promoter sequences are represented by a black arrow.

From the partial amino acid sequence of purified CurG15 (SakX) (Table IV.6), degenerate primers were deduced and used for PCR reactions in combination with vector-specific primers (Table IV.2). Nucleotide sequencing of the resulting PCR products permitted the elucidation of 1,743 contiguous nucleotides whose analysis revealed the presence of 5 putative ORFs collinearly-arranged corresponding to SakT structural genes (*sakT_α* and *sakT_β*), and their putative immunity gene (*sakI_T*), and SakX structural gene (*sakX*) and its putative immunity gene (*sakI_x*) (Figs. 4.5 and 4.6). The obtained sequence is identical to that of sakacin TX cluster described by Vaughan *et al.* (2003) in a *Lb. sakei* strain, except for one mismatch at nucleotide position 340 (G instead of T) within the *sakT_α* gene, which results in the replacement of valine (V) by glycine (G) at position 40 in the mature bacteriocin SaKT_α (Gly40/Val40) (Table IV.6). Moreover, in the sakacin TX cluster described in *Lb. curvatus* BCS35, a sixth ORF (*orf6*) was identified in the opposite strand (Fig. 4.5, 4.6, and 4.7), which partially overlaps with *sakT_β* and *sakI_T*, and encodes a putative 120 amino acid protein of unknown function with a molecular weight of 13,324.9 Da and a theoretical pI of 9.26.

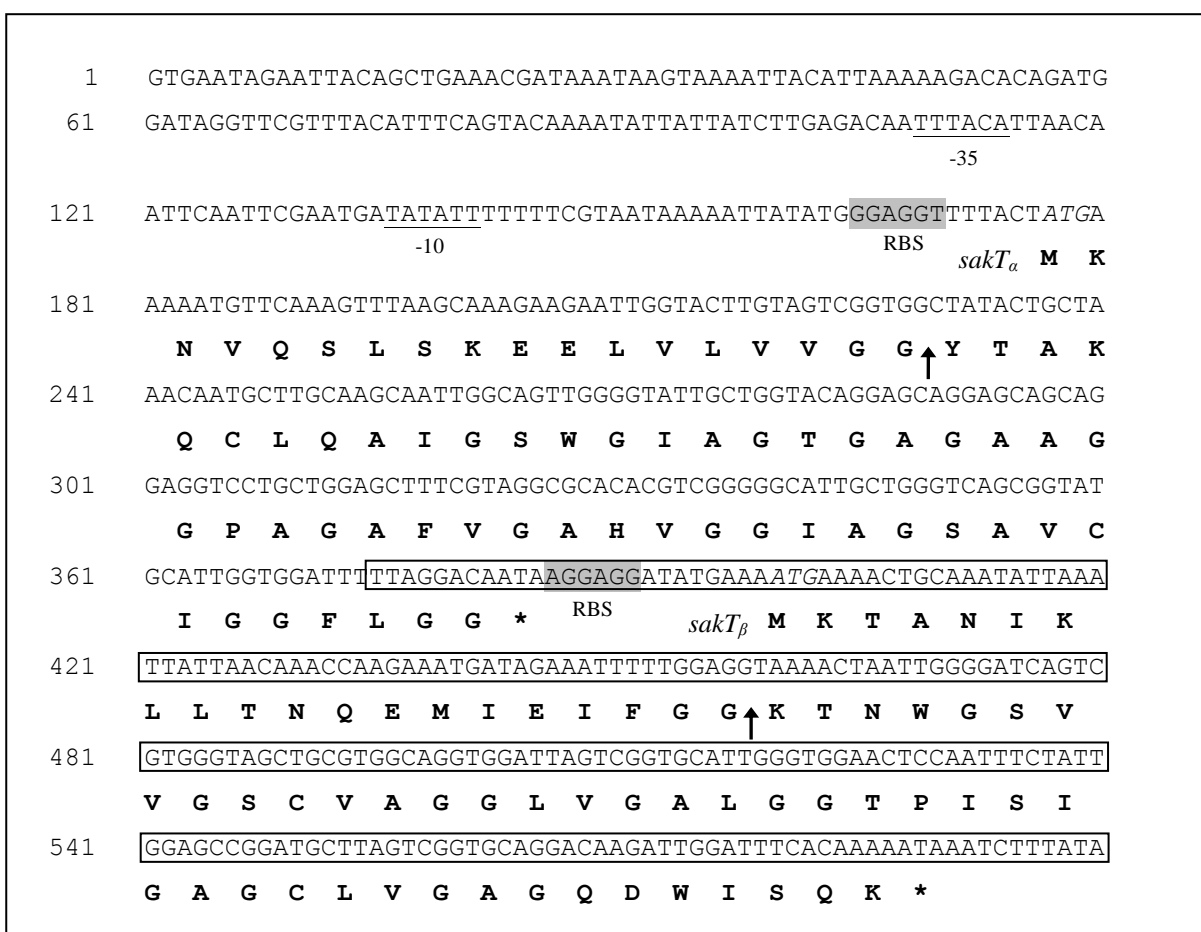


Figure 4.5. Nucleotide sequence of a 1,743-bp fragment from *Lb. curvatus* BCS35 containing the structural genes of sakacin T (*sakT_α* and *sakT_β*) and sakacin X (*sakX*) and their putative immunity genes (*sakI_T* and *sakI_x*, respectively). The deduced amino acid sequences are shown below the DNA sequence. Putative ribosome binding sites (RBS) are highlighted in grey. The putative -35 and -10 promoter sequences are underlined, and start codons are shown in italics. Stop codons are indicated by asterisks at the end of the protein sequences. The cleavage sites of the prepro bacteriocins are indicated by a vertical arrow. The putative protein of 120 amino acids (*orf6*) is enclosed in a box.

601	AGGAGGATTACTATGCCGAAGAACGAAAAAAGGATCTCTTTTAACTGCTTCTATAGCG
	RBS <i>sakI_r</i> M P K N E K K D L F L T A S I A
661	ATAATTGGGCTGACAGCAATATACTTTTCAAATACATTTTGAATAGTTTAGCGATGTCG
	I I G L T A I Y F S N T F L N S L A M S
721	TTTTTATTAATCGGCATAGTAGTCTTAACTACTCTACCAGTTCAAATCAGAAAAAAGAAA
	F L L I G I V V L T T L P V Q I R K K K
781	CAACGCAGATTAATTACGGATTATTTAAATAGAATCGATACTACTTTACAAAAAATATT
	Q R R L I T D Y L N R I D T T L Q K N I
841	TATGAAGCTACTCAAGTCACTCCGAACCAATTAATAAATTATACTGTACTAGGGACTGGC
	Y E A T Q V T P N Q L K N Y T V L G T G
901	ATAGCATCTTCTAAGCTTTATAAAATTGAAGAAATCATATCAAAGATGTAGATAGCATGT
	I A S S K L Y K I E E I I S K M *
961	TCATTTAATCATTTAGTAGTATTTCTATTACATTATAATTGATGAAAATAGATTCTTATA
1021	GGCAGTATTTGAACCAAGGTAGATGGTCGTTGAATACAATTTTCGATGTACAAAAAATA
	-35 -10
1081	AAGATGGAGTGTGTTATTATGGAAGCAATCAAAAAATTAGATTTACAAGCTATGAAAGGT
	RBS <i>sakX</i> M E A I K K L D L Q A M K G
1141	ATTGTCGGGGGAAAATACTACGGTAATGGATTGTCTTGTAACAAAAGTGTTGTTTCAGTT
	I V G G ↑ K Y Y G N G L S C N K S G C S V
1201	GACTGGAGTAAAGCTATTAGTATTATCGGGAATAATGCTGTAGCAAATTTGACTACCGGT
	D W S K A I S I I G N N A V A N L T T G
1261	GGAGCTGCTGGCTGGAATCTTAACATTCTTTGGTATCCGCCTTTTCTAATACCTTTTTT
	G A A G W K S *
1321	ATAGTAGATTTTCAATTAGTAGTAATTTAATCTACTGCTTTATATCGAAGAAGTATTGA
1381	ATAACATATGAATAATTATTAGTAGGTGAAAATATGTCTAAAGTTAAATGGTTTTCTGG
	RBS <i>sakI_x</i> M S K V K W F S G
1441	TGGAGTCGAAAGAGGTAACCAAGCAGTACAAATTATTAATGAATTGCTTAACGATGACAA
	G V E R G N Q A V Q I I N E L L N D D K
1501	GATAATTTTCAGACAGTCCATTAGAAATAACTCTAAAGAAATACAGAATAGAGCTACAGCA
	I I S D S P L E I T L K K Y R I E L Q Q
1561	AAAAGAATCATCTATACCTTTTATTCTAAGCCGAATGAATCTAGATATATCAAAGCTTT
	K E S S I P F I L S R M N L D I S K A L
1621	GCGAAGTGATCCGAATCAACTCAGCAAAGAACAATAAGCTAAAAAATCTAACTTC
	R S D P N Q L S K E Q T N K L K N L T S
1681	TTTGTCAAATATTAGATACGGTTATTAAGTAGATAAACAGACGATTTTCTGTGGTTTGGT
	L S N I R Y G Y *
1741	ATA

Figure 4.5. Continued.


```

1141 CCTTATAAAGATTTATTTTTGTGAAATCCAATCTTGTCTCTGCACCGACTAAGCATCCGGC
      L I K I Y F C E I Q S C P A P T K H P A
1201 TCCAATAGAAATTGGAGTTCCACCCAATGCACCGACTAATCCACCTGCCACGCAGCTACC
      P I E I G V P P N A P T N P P A T Q L P
1261 CACGACTGATCCCCAATTAGTTTTACCTCCAAAAATTTCTATCATTTCTTGGTTTGTAA
      T T D P Q L V L P P K I S I I S W F V N
1321 TAATTTAATATTTGCAGTTTTTCATTTTCATATCCTCCTTATTGTCCTAAAAATCCACCAA
      N L I F A V F I F I S S L L S *
1381 TGCATACCGCTGACCCAGCAATGCCCCGACGTGTGCGCCTACGAAAGCTCCAGCAGGAC
1441 CTCCTGCTGCTCCTGCTCCTGTACCAGCAATACCCCAACTGCCAATTGCTTGCAAGCATT
1501 GTTTAGCAGTATAGCCACCGACTACAAGTACCAATTCTTCTTTGCTTAAACTTTGAACAT
1561 TTTTCATAGTAAAACCTCCCATATAATTTTTATTACGAAAAAATATATCATTCGAATTG
1621 AATTGTTAATGTAAATTGTCTCAAGATAATAATTTTTGTACTGAAATGTAAACGAACCT
1681 ATCCATCTGTGTCTTTTTAATGTAATTTTACTTATTTATCGTTTCAGCTGTAATTCTATT
1741 CAC

```

Figure 4.7. Continued.

By using specific primers for SakQ structural gene (*sppQ*) and DNA from *Lb. curvatus* BCS35, a PCR product of 189-pb was obtained. The amplicon was purified and sequenced revealing a nucleotide sequence (Fig. 4.8) identical to that of *sppQ* from *Lb. curvatus* L442 and *Lb. curvatus* LTH1174 described by Cocolin and Rantsiou (2007). However, the sequence of SakQ from *Lb. curvatus* strains shows a deletion of 5 amino acid residues (AWGAG) with respect to SakQ from *Lb. sakei* LTH673 described by Mathiesen *et al.* (2005) (Table IV.6).

```

1   ATGCAAAATACAAAAGAACTAAGCGTAGTAGAATTACAACAAATTCTTGGAGGAAAACGT
sppQ M Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G ↑ K R
61  GCTAGCTTTGGTAAATGTGTAGTTGGTGCAGCTGGTTTAGGAGCCGGAGTCAGTGGTGGT
      A S F G K C V V G A A G L G A G V S G G
121 CTCTGGGGAATGGCTGCTGGTGGTATCGGCGGAGAATTAGCTTACATGGGGGCTAACGGG
      L W G M A A G G I G G E L A Y M G A N G
181 TGTCTCTAA
      C L *

```

Figure 4.8. Nucleotide sequence of a 189-bp fragment from *Lb. curvatus* BCS35 containing the structural gene of sakacin Q (*sppQ*). The deduced amino acid sequence is shown below the DNA sequence. Start codon is shown in italics. Stop codon is indicated by an asterisk at the end of the protein sequence. The cleavage site of the preprobacteriocin is indicated by a vertical arrow.

IV.4.5. Specific antimicrobial activity of the purified class IIa bacteriocins CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP and PedPA-1

Purified CurG14 (SakP variant) and CurG15 (SakX) produced by *Lb. curvatus* BCS35, SakP produced by *Lb. sakei* LTH673, and PedPA-1 produced by *P. acidilactici* 347 were challenged against eight *Listeria* spp. and eight LAB strains by an MPA. The comparison of the specific antimicrobial activity of these four class IIa bacteriocins revealed that PedPA-1 was, in general, the most active peptide against the majority of the indicator strains (Table IV.7). CurG14 (SakP variant) was significantly less active than SakP against 4 out of the 8 *Listeria* spp. strains and 1 of the 8 LAB strains, and also significantly less active than PedPA-1 against, at least, 11 out of 13 indicator microorganisms. On the other hand, when comparing CurG15 (SakX) with SakP, the specific antimicrobial activity ratio showed that the former bacteriocin was much more active against 3 out of the 8 *Listeria* spp. strains, similarly effective towards the other 3 strains, and less effective against the rest of the *Listeria* spp. strains. However, CurG15 (SakX) and SakP showed a similar antimicrobial potency against most LAB indicators. CurG15 (SakX) exerted a slightly higher antimicrobial activity than PedPA-1 against *Listeria* spp. but a much lower potency against LAB strains.

Table IV.7. Comparative specific antimicrobial activity of purified class IIa bacteriocins CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP and PedPA-1.

Indicator microorganisms ^a	Specific antimicrobial activity (BU/ng) ^b				Specific antimicrobial activity ratio ^c				
	CurG14 (SakP variant)	CurG15 (SakX)	SakP	PedPA-1	CurG14/ CurG15	CurG14/ SakP	CurG14/ PedPA-1	CurG15/ SakP	CurG15/ PedPA-1
<i>Listeria</i> spp. strains									
<i>L. monocytogenes</i> CECT911	9.8×10 ⁶	1.4×10 ⁸	7.2×10 ⁶	> 7.7×10 ⁷	0.1	1.4	< 0.1	19.6	< 1.8
<i>L. monocytogenes</i> CECT932	2.6×10 ⁷	> 1.4×10 ⁸	2.3×10 ⁸	> 7.7×10 ⁷	< 0.2	0.1	< 0.3	> 0.6	Ne
<i>L. monocytogenes</i> CECT935	0.7	0.5	0.5	2.4×10 ⁶	1.4	1.3	2.7×10 ⁻⁷	1.0	2.0×10 ⁻⁷
<i>L. monocytogenes</i> CECT936	2.1×10 ⁸	> 1.4×10 ⁸	2.3×10 ⁸	> 7.7×10 ⁷	< 1.5	0.9	< 2.7	> 0.6	Ne
<i>L. monocytogenes</i> CECT4031	2.1×10 ⁸	> 1.4×10 ⁸	1.3×10 ¹⁰	> 7.7×10 ⁷	< 1.5	2.0×10 ⁻²	< 2.7	> 1.1×10 ⁻²	Ne
<i>L. monocytogenes</i> CECT4032	0.7	0.7	2.2×10 ²	2.4×10 ⁴	1.0	3.4×10 ⁻³	3.0×10 ⁻⁵	3.3×10 ⁻³	3.0×10 ⁻⁵
<i>L. ivanovii</i> CECT913	8.2×10 ⁵	> 4.7×10 ¹⁵	7.6×10 ⁷	> 2.6×10 ¹⁵	< 1.8×10 ⁻¹⁰	1.0×10 ⁻²	< 3.2×10 ⁻¹⁰	> 6.2×10 ⁷	Ne
<i>L. grayi</i> CECT931	5.1×10 ⁴	> 1.4×10 ⁸	6.8×10 ⁴	> 7.7×10 ⁷	< 3.6×10 ⁻⁴	0.8	< 6.6×10 ⁻⁴	> 2.1×10 ³	Ne
LAB strains									
<i>P. pentosaceus</i> FBB61	0.0	0.4	0.0	1.5×10 ²	0.0	-	6.8×10 ⁻³	0.4	3.0×10 ⁻³
<i>P. pentosaceus</i> FBB63	0.7	0.5	0.6	1.2×10 ²	1.4	1.1	5.4×10 ⁻³	0.8	3.8×10 ⁻³
<i>E. faecium</i> L50	0.4	0.5	0.4	5.9×10 ²	0.8	0.9	6.6×10 ⁻⁴	1.2	8.6×10 ⁻⁴
<i>E. faecium</i> P13	0.8	1.1	0.0	2.4×10 ³	0.7	0.8	3.3×10 ⁻⁴	1.1	4.5×10 ⁻⁴
<i>Lb. sakei</i> Lb706	2.0×10 ⁻²	8.4	0.0	9.2	2.4×10 ⁻³	2.0×10 ⁻²	2.7×10 ⁻³	8.4	0.9
<i>Lb. curvatus</i> BCS35	0.0	0.0	0.0	9.0×10 ⁻³	-	-	-	-	-
<i>Lb. sakei</i> LTH673	0.0	Nd	0.0	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd
<i>P. acidilactici</i> 347	0.0	0.0	Nd	0.0	-	Nd	-	Nd	-

^aFor indicator microorganisms see Table IV.1. ^bSpecific antimicrobial activity (BU/ng) as determined by an MPA (BU/ml), and considering the concentration of purified bacteriocins (ng/ml) obtained from the A_{280} using the molar extinction coefficients. Nd, not determined. Ne, not evaluable. ^cRatio calculated by dividing the specific antimicrobial activity of bacteriocin X by that of bacteriocin Y.

IV.4.6. In vitro safety in vitro evaluation of *Lb. curvatus* BCS35

Antibiotic susceptibility patterns of *Lb. curvatus* BCS35 were phenotypically determined by a broth microdilution test. Based on the obtained MICs and according to the FEEDAP breakpoints adopted by EFSA (EFSA, 2008, 2011, 2012), *Lb. curvatus* BCS35 is susceptible to all the tested antibiotics (Table IV.8). Moreover, *Lb. curvatus* BCS35 showed no hemolysin, gelatinase and protease activities (results not shown).

Table IV.8. Antibiotic susceptibility of *Lb. curvatus* BCS35^a.

Antibiotic		Test range (µg/ml)	MICs (µg/ml) ^b	FEEDAP BPs values ^{c, d}	Susceptibility/ Resistance ^d
Mechanism of action/ Family					
Cell wall synthesis inhibitors					
Penicillins	Ampicillin	0.125-128	0.5	4	S
Glycopeptides	Vancomycin	0.125-128	16	Nr	R*
Protein synthesis inhibitors					
Macrolides	Erythromycin	0.125-128	0.5	1	S
	Azithromycin	0.500-512	4	Ns	Na
	Clarithromycin	0.500-512	1	Ns	Na
Streptogramins	Quinupristin-dalfopristin	0.500-512	≤0.5	4	S
Tetracyclines	Tetracycline	0.125-128	1	8	S
Amphenicols	Chloramphenicol	0.125-128	1	4	S
Aminoglycosides	Kanamycin	0.500-512	16	64	S
	Gentamycin	0.500-512	8	16	S
	Streptomycin	0.500-512	16	64	S
Nucleic acid synthesis inhibitors					
Rifamycins	Rifampicin	0.500-512	≤0.5	Ns	Na
Quinolones	Nalidixic acid	0.500-512	16	Ns	Na
	Levofloxacin	0.125-128	64	Ns	Na

^aAntibiotic susceptibility was determined by a broth microdilution test. MICs were estimated as the lowest concentration of the antibiotic at which no growth of the test microorganism was observed. ^bBreakpoints (BPs) suggested by FEEDAP and adopted by EFSA (EFSA, 2008, 2011, 2012). BPs for azythromycin, clarithromycin, rifampicin, nalidixic acid, and levofloxacin have been not suggested (Ns) by FEEDAP. ^cBased on the FEEDAP BPs, *Lb. curvatus* BCS35 was categorized as susceptible (S) or resistant (R) to the respective antibiotic. *Lb. curvatus* is intrinsically resistant to vancomycin (R*), thus the BP for this antibiotic is not required (Nr). Na, not applicable.

IV.5. DISCUSSION

The last decade has seen a growing interest in food biopreservation through the use of microorganisms and/or their metabolites, and LAB are of particular interest as biopreservatives due to their antimicrobial activity against spoilage and food-borne pathogenic bacteria. In this respect, class IIa bacteriocins produced by LAB are considered amongst the most interesting antimicrobial peptides for use, not only in food biopreservation (Cleveland *et al.*, 2001), but also in medicine as antibiotic complements for treating infectious diseases (Ingham *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005; Corr *et al.*, 2007). Before the industrial use of class IIa bacteriocins it is important to unravel the mode of action of these molecules, as well as their structure-function relationships, which may allow future development of bacteriocins into drugs for treatment of infections and additives for preservation of food and animal

feed (Rihakova *et al.*, 2009). In this respect, the development of bacteriocins into new antimicrobial agents is of considerable importance in view of the dramatic increase in antibiotic resistant pathogenic bacteria and the undesirable side effects of many chemical preservatives (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

In a previous work (Chapter III), four bacteriocinogenic *Lactobacillus* spp. strains were selected from a total of 1,245 LAB isolated from fish, seafood and fish products. From these strains, *Lb. curvatus* BCS35, isolated from dry-salted cod, stands out because of its broad and strong antimicrobial activity against the food-borne pathogen *L. monocytogenes* and several fish spoilage and pathogenic bacteria, such as *Br. thermosphacta*, *C. piscicola* and *Sh. putrefaciens*. *Lb. curvatus* and its closely related species *Lb. sakei* are one of the most important components of starter cultures for the production of fermented meat products (Schillinger and Lücke, 1989; Urso *et al.*, 2006; Dortu *et al.*, 2008). In the last decade, the isolation and characterization of bacteriocin- and non-bacteriocin-producing strains of *Lb. curvatus* and *Lb. sakei* have been reported, mainly from the meat environment (Holck *et al.*, 1994; Cocolin *et al.*, 2004; Rantsiou *et al.*, 2005; Najjari *et al.*, 2008; Ben Belgacem *et al.*, 2009; Audenaert *et al.*, 2010; Lorenzo *et al.*, 2010), but also from fermented fish products (Lyhs *et al.*, 1999, 2002; Lyhs, 2002; Najjari *et al.*, 2008; Lyhs and Björkroth, 2008), fermented vegetables (Vogel *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2004) and, to a lesser extent, cheese (Colombo *et al.*, 2009; Serhan *et al.*, 2009). Moreover, several authors have already demonstrated the effectiveness of bacteriocin-producing *Lb. sakei* and *Lb. curvatus* strains for the inhibition of *L. monocytogenes* in several meat and fish products (Katla *et al.* 2001; Benkerroum *et al.*, 2005; Katikou *et al.* 2005; Castellano and Vignolo 2006; Ghalfi *et al.* 2006; Héquet *et al.* 2007; Dortu *et al.*, 2008). Up to date, a number of bacteriocins produced by *Lb. curvatus*, referred to as curvacins, have been identified and, in some cases, characterized, including CurA (the first curvacin described) produced by *Lb. curvatus* LTH1174, isolated from a fermented meat (Tichaczek *et al.*, 1993); curvaticin 13 from *Lb. curvatus* SB13, isolated from a Belgian sausage (Sudirman *et al.*, 1993); curvaticin FS47 from *Lb. curvatus* FS47, isolated from a retail meat (Garver and Muriana, 1994), and curvaticin L442 from *Lb. curvatus* L442, isolated from a Greek traditional fermented sausage (Xiraphi *et al.*, 2006). Moreover, the presence of bacteriocin structural genes encoding sakacins in *Lb. curvatus* strains is becoming increasingly evident (Cocolin and Rantsiou, 2007). In this respect, CurA is identical to SakA produced by *Lb. sakei* Lb706 (Schillinger and Lucke, 1989) and to sakacin K from *Lb. sakei* CTC494 (Hugas *et al.*, 1995; Axelsson and Holck, 1995; Aymerich *et al.*, 2000; Leroy and de Vuyst, 2005); and curvaticin L442 (Xiraphi *et al.*, 2006) shares a high degree of homology with SakP, a bacteriocin produced by several strains of *Lb. sakei*. Regarding to this, Cocolin and Rantsiou (2007) proposed that the bacteriocin produced by *Lb. curvatus* L442 should be referred to as SakP. Lately, Héquet *et al.* (2007) described the presence of the genes encoding the class IIa bacteriocins SakX and SakP, and the class IIb bacteriocin SakT (SakT_α and SakT_β), firstly described in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), in *Lb. curvatus* 2711. The class IIc bacteriocin SakQ, that seems to be located in the same operon as SakP (Mathiesen *et al.*, 2005), was first described in *Lb. sakei* Lb674 and LTH673 (Mathiesen *et al.*, 2005), and then in *Lb. curvatus* L442 and LTH1174 (Cocolin and Rantsiou, 2007).

In this work, a multichromatographic procedure was used for the purification of the bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, resulting in two well-separated fractions with antimicrobial activity after the last RP-FPLC (fractions A and B). These results demonstrated that the antimicrobial activity exerted by this strain is due to the production of, at least, two bacteriocins, termed curvacin G14 (CurG14) and curvacin G15 (CurG15). Spectrometry analysis of CurG14 revealed a molecular mass of 4,460.97 Da, and DNA sequencing analysis showed that this bacteriocin only differs from the class IIa SakP produced by several *Lb. sakei* strains at position 12 of the mature bacteriocin (Tyr12 instead of His12), which fits in with the difference found in their molecular masses (26 Da; 4,460.97 and 4,435.14 Da, respectively) (Table IV.6). Interestingly, this mismatch was also described by Cocolin and Rantsiou (2007) for the SakP variants produced by *Lb. curvatus* L442 and LTH1174. On the other hand, mass spectrometry analysis of CurG15 yielded a molecular mass of 4,362.65 Da, and DNA analysis showed that, despite the putative amino acid difference detected by Edman degradation (aspartate instead of asparagine at position 32, Table IV.6), this bacteriocin is identical to the class IIa SakX produced by different *Lb. sakei* and *Lb. curvatus* strains. Moreover, DNA sequencing analysis of *Lb. curvatus* BCS35 genome also revealed the presence of the genes encoding the class IIb bacteriocin SakT (SakT_α and SakT_β), and the structural gene of the class IIc bacteriocin SakQ (Table IV.6), which were firstly identified in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003) and *Lb. sakei* LTH673 (Mathiesen *et al.*, 2005), respectively. With regard to this, multiple bacteriocin production by a single bacterial strain has been previously described in other LAB, such as *E. faecium* (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 2000), *Leuconostoc mesenteroides* (Revol-Junelles *et al.*, 1996; Papathanasopoulos *et al.*, 1997), *Lactococcus lactis* (van Belkum *et al.*, 1989), *Lactobacillus plantarum* (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Anderssen *et al.*, 1998; Prins *et al.*, 2010), *C. piscicola* (Quadri *et al.*, 1994; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996), and *Streptococcus mutans* (Nes *et al.*, 2007). Even though the production by the same strain of bacteriocins belonging to different classes has been previously reported (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005; Mathiesen *et al.*, 2005; Cocolin and Rantsiou, 2007; Héquet *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Ghalfi *et al.*, 2010), to our knowledge, this is the first work describing the presence of structural genes encoding class IIa (CurG14 [SakP variant] and CurG15 [SakX]), class IIb (SakT_α and SakT_β), and class IIc (SakQ) bacteriocins in a single *Lactobacillus* spp. strain. Our results suggest that the broad antimicrobial activity of the culture supernatant from *Lb. curvatus* BCS35 is due to the combined action of these bacteriocins; however, complementary purification experiments would be required to verify the effective production of SakT (SakT_α and SakT_β), and/or SakQ by this strain, and to establish their individual contribution to its total antimicrobial activity.

Despite their high structural similarity, class IIa (pediocin-like) bacteriocins differ markedly in their antimicrobial activity spectrum (Drider *et al.*, 2006), which makes these peptides especially well-suited for analyzing the relationship between structure and antimicrobial spectrum and target-cell specificity (Eijsink *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 1998b; Guyonnet *et al.*, 2000; Katla *et al.*, 2003). The purification procedure used in this work allowed to obtain high enough quantities of pure CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP and PedPA-1, which is a required prerequisite to compare their antimicrobial spectra and specific activity. The comparison of the specific antimicrobial activity of these four class

IIa bacteriocins (Table IV.7) showed that PedPA-1 is the most active bacteriocin against most of the tested indicator microorganisms. When comparing CurG15 (SakX) with SakP, the specific antimicrobial activity ratio showed that CurG15 (SakX) is much more or similarly active against *Listeria* spp.; however, both bacteriocins showed a similar potency against most LAB strains. Moreover, the comparison of CurG15 (SakX) with PedPA-1 showed that CurG15 exerts a slightly higher antimicrobial activity towards *Listeria* spp. strains but a much lower potency against LAB strains. In a previous study, Eijsink *et al.* (1998) measured the activities of four purified bacteriocins (including SakP and PedPA-1) against a large array of indicator microorganisms, revealing that SakP had low activity towards LAB strains, which is in agreement with our results. However, in contrast with our observations, in which PedPA-1 resulted more effective against *Listeria* spp., SakP was as effective as PedPA-1 against these microorganisms. When comparing CurG14 (SakP variant) with the other purified bacteriocins, it was shown to be less active than SakP, PedPA-1, and CurG15 (SakX) against nearly all the indicators. These observations could be explained on the basis of the structural differences between class IIa bacteriocins, which has been thoroughly studied and reviewed (Kazazic *et al.*, 2002; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008; Rihakova *et al.*, 2009).

Based on their primary structure, the peptide chains of class IIa bacteriocins may be divided into two regions: (i) a hydrophilic, cationic and highly conserved N-terminal half; (ii) and a less conserved, hydrophobic and/or amphiphilic C-terminal half (Kazazic *et al.*, 2002). The 3D structure of several class IIa bacteriocins has been elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, indicating that the N-terminal half forms a β -sheet-like domain which is structurally stabilized by a conserved disulfide bridge, and the C-terminal half consists of one or two α -helices, often ending with a structurally extended C-terminal tail that folds back onto the central α -helix, thereby creating a hairpin-like structure (Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008). In the C-terminus, a few class IIa bacteriocins, such as PedPA-1, contain an additional C-terminal disulfide bridge which plays an important role in stabilizing its 3D structure (Uteng *et al.*, 2003; Fimland *et al.*, 2005). With regard to this, it has been shown that these structurally stabilized bacteriocins display much higher antimicrobial potency than those containing only one disulfide bridge (*e.g.*, CurG14 and SakP), especially at high temperatures (Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Rihakova *et al.*, 2009). Therefore, the wider antimicrobial spectrum observed in this study for PedPA-1 compared to SakP, CurG14, and SakX, the three of them lacking the additional C-terminal disulfide bridge, is not surprising. Although most pediocin-like bacteriocins (*e.g.*, CurG14 and SakP) lack the additional disulfide bridge, they contain a tryptophan (Trp) residue near the C-terminal domain (Trp41 in SakP, CurG14 and SakX), which stabilizes the hairpin structure (Fimland *et al.*, 2002). Interestingly, these bacteriocins, especially SakP and SakX, are very active against *Listeria* spp. but not against LAB, contrary to PedPA-1, which makes them promising candidates to be used as antilisterial agents in foods, either by adding the pure bacteriocins as food additives or the bacteriocinogenic strain as starter and/or protective culture, without interfering with the beneficial food microbiota. Site-directed mutagenesis and peptide-binding studies have demonstrated that the N-terminal half mediates the initial binding of pediocin-like bacteriocins to the anionic membranes of the target cells through

electrostatic interactions (Chen *et al.*, 1997; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999; Kazazic *et al.*, 2002; Uteng *et al.*, 2003; Fimland *et al.*, 2006), whereas the C-terminal half penetrates into the hydrophobic part of the target-cell membrane, thereby mediating membrane leakage (Fimland *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2002; Uteng *et al.*, 2003; Johnsen *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2008; Rihakova *et al.*, 2009). It has been proposed that the C-terminal half of pediocin-like bacteriocins is important in determining their target cell specificity because variants mutated in the C-terminal region often differ from the wild-type in their target cell specificity (Fimland *et al.*, 2000, 2002). Moreover, the target-cell specificity of hybrid bacteriocins constructed by joining N- and C-terminal regions from different pediocin-like peptides is similar to that of the peptide from which the C-terminal domain was derived, indicating that the C-terminal domain is the major specificity determinant (Johnsen *et al.*, 2005). The role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of SakP has been previously studied by means of site-directed mutagenesis (Kazazic *et al.*, 2002). In this respect, SakP contains one negatively (Asp17) and five positively charged residues (Lys1, Lys11, Lys43, His8 and His12), which, with the exception of Lys43, are all clustered in the N-terminal half of the bacteriocin. Amongst the mutations that render SakP less cationic, that engineered at position 12 (Thr12/His12) was one of the most deleterious in terms of the antimicrobial potency of the bacteriocin (Kazazic *et al.*, 2002). In this work, we describe that CurG14 is a wild SakP variant which contains one less positively charged residue in the N-terminal half (Tyr12/His12) (Table IV.6). Comparison of the antimicrobial activity of both purified bacteriocins showed that CurG14 has a reduced antimicrobial potency against most of the tested indicator strains, nevertheless, as expected, has the same antimicrobial specificity. The reduction of the antimicrobial potency depended on the indicator strain, ranging from 10 (*L. monocytogenes* CECT932) to 1,000 (*L. monocytogenes* CECT4032) times. Therefore, our results further confirm the importance of the cationic character of this patch in the middle of the N-terminal half of SakP/CurG14 in the initial electrostatic binding of the bacteriocins to the target cells for determining their antimicrobial potency and, in combination with the C-terminal half, their target-cell specificity.

Most lactobacilli, including *Lb. curvatus*, have been awarded the QPS status by EFSA; however, in recent years, antibiotic resistance of LAB of food origin has motivated great interest since these bacteria, including *Lactobacillus* spp., may act as reservoirs for antibiotic-resistance genes (Bernardeau *et al.*, 2008). Therefore, fermented food products have received increasing attention as potential vehicles for spreading of antibiotic resistance genes, with the consequent risk of their horizontal transfer to LAB and/or pathogenic bacteria (Danielsen and Wind, 2003; Hummel *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Comunian *et al.*, 2010). With regard to this, EFSA has recently updated the criteria to be used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance (EFSA, 2008, 2011, 2012), and enforced that before launching a starter and/or protective culture or a probiotic product into the market, it is mandatory to verify, at least, the absence of transferable antibiotic resistance genes in the component LAB strain(s). In this respect, *in vitro* safety evaluation of *Lb. curvatus* BCS35 was carried out by the broth microdilution test (Klare *et al.*, 2005) for 14 clinically relevant antibiotics belonging to different groups. Based on our results, *Lb. curvatus*

BCS35 may be considered as a safe strain since it is sensitive to all the antibiotics specified by EFSA (EFSA, 2008, 2011).

The results described herein encourage the further genetic and immunochemical characterization of the multiple bacteriocin producer *Lb. curvatus* BCS35, a harmless strain of fish origin producing, at least, the two broad spectrum class IIa bacteriocins CurG14 [SakP variant] and CurG15 [SakX], as well as the *in situ* evaluation of this strain as food biopreservative in the fishery industry as part of a hurdle preservation technology.

IV.6. REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. G. Eijsink, and J. Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269–2272.
- Audenaert, K., K. D'Haene, K. Messens, T. Ruysen, P. Vandamme, and G. Huys. 2010. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 27: 12–18.
- Autio, T., S. Hielm, M. Miettinen, A. M. Sjöberg, K. Aarnisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm, and H. Korkeala. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 150–155.
- Axelsson, L. and A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177: 2125–2137.
- Aymerich, T., M. Garrigaa, J. M. Monfort, I. F. Nes, and M. Hugas. 2000. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiol.* 17:33–45.
- Bessis, D., A. Le Quellec, A. Sotto, C. Perez, and A. J. Ciurana. 1995. *Lactobacillus acidophilus* endocarditis after an appendectomy. *Clin. Infect. Dis.* 20: 724–725.
- Ben Belgacem, Z., X. Dousset, H. Prevost, and M. Manai. 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Arch. Microbiol.* 191: 711–720.
- Benkerroum, N., A. Daoudi, T. Hamraoui, H. Ghalfi, C. Thiry, M. Duroy, P. Evrart, D. Roblain, and P. Thonart. 2005. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98: 56–63.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet, and M. Gueguen. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 278–285.
- Bhugaloo-Vial, P., X. Dousset, A. Metivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval, and D. Marion. 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4410–4416.

- Bhugaloo-Vial, P., J. P. Douliez, D. Moll, X. Dousset, P. Boyaval, and D. Marion.** 1999. Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2895–2900.
- Bortolussi, R.** 2008. Listeriosis: a primer. *CMAJ* 179: 795–797.
- Brett, M. S. Y., P. Short, and J. McLauchlin.** 1998. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 223–229.
- CAC (Codex Alimentarius Commission).** 1999. Revised regional guidelines for the design of control measures for street-vended foods in Africa. CAC/GL-22–Rev. 1 (1999).
- CAC.** 2007. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in Foods. CAC/GL-61–2007.
- Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos, and L. H. Danziger.** 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 31–40.
- Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Castellano, P. and G. Vignolo.** 2006. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 194–199.
- Chen, Y., R. D. Ludescher, and T. J. Montville.** 1997. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770–4777.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 281–305.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen, and P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 22–28.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.

- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Urso, C. Cantoni, and G. Comi.** 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1883–1894.
- Cocolin, L. and K. Rantsiou.** 2007. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1403–1411.
- Colombo, F., F. Borgo, and M. G. Fortina.** 2009. Genotypic characterization of non starter lactic acid bacteria involved in the ripening of artisanal Bitto PDO cheese. *J. Basic Microbiol.* 49: 521–530.
- Comunian, R., E. Daga, I. Dupre, A. Paba, C. Devirgiliis, V. Piccioni, G. Perozzi, D. Zonenschain, A. Rebecchi, L. Morelli, A. De Lorentiis, and G. Giraffa.** 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 151–156.
- Corr, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill, and C. G. Gahan.** 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 7617–7621.
- Cossart, P.** 2007. Listeriology (1926–2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect.* 9: 1143–1146.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Danielsen, M. and A. Wind.** 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 1–11.
- Davies, J., E. Ewan, P. Varughese, and S. Acres.** 1984. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Clin. Invest. Med.* 7: 315–320.
- de Valk, H., V. Vaillant, C. Jacquet, J. Rocourt, F. Le Querrec, F. Stainer, N. Quelquejeu, O. Pierre, V. Pierre, J. C. Desenclos, and V. Goulet.** 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999–February 2000. *Am. J. Epidemiol.* 154: 944–950.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Dortu, C., M. Huch, W. H. Holzapfel, C. M. Franz, and P. Thonart.** 2008. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 581–586.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchar, L. M. McMullen, and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Duffes, F., C. Corre, F. Leroi, X. Dousset, and P. Boyaval.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ*-produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4 °C and 8 °C. *J. Food Prot.* 62: 1394–1403.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Brussels, Belgium.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.

- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, October 2005.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.
- EFSA.** 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732: 1–15.
- EFSA.** 2011. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9:1–82.
- EFSA.** 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobial of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10: 2740.
- Eijsink, V. G., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven, and I. F. Nes.** 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178: 2232–2237.
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg, and I. F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria, an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato, and T. Matsui.** 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad, and W. Tham.** 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2904–2907.
- Farber, J. M. and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476–511.
- FAO (Food and Agricultural Organization).** 2004. Risk assesement of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological Risk Assessment Series, No. 5: 265.
- FDA/FSIS (U. S. Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Service).** 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-toeat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition (USDA) and Food Safety Inspection Service.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes, and J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3313–3318.
- Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. Eijsink, and J. Nissen-Meyer.** 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643–2648.
- Fimland, G., V. G. Eijsink, and J. Nissen-Meyer.** 2002. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* 41: 9508–9515.

- Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus, and J. Nissen-Meyer.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11: 688–696.
- Fimland, G., J. Pirneskoski, J. Kaewsrichan, A. Jutila, P. E. Kristiansen, P. K. Kinnunen, and J. Nissen-Meyer.** 2006. Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 1132–1140.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Garver, K. I. and P. M. Muriana.** 1994. Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2191–2195.
- Ghalfi, H., A. Allaoui, J. Destain, N. Benkerroum, and P. Thonart.** 2006. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Prot.* 69: 1066–1071.
- Ghalfi, H., N. Benkerroum, M. Ongena, M. Bensaid, and P. Thonart.** 2010. Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. *Food Res. Int.* 43: 33–39.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall, and D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Giraffa, G., N. Chanishvili, and Y. Widyastuti.** 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* 161: 480–487.
- Graves, L. M., B. Swaminathan, and S. B. Hunter.** 1999. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: “*Listeria, listeriosis and food safety*“, 2nd edition, pp. 279–297. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds.), Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J. M. Berjeaud.** 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1744–1748.
- Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart.** 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 423–434.
- Haugen, H. S., P. E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer.** 2008. Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6766–6773.
- Håvarstein, L. S., D. B. Diep, and I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229–240.
- Héquet, A., V. Laffitte, L. Simon, D. De Sousa-Caetano, C. Thomas, C. Fremaux, and J. M. Berjeaud.** 2007. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 67–74.
- Holck, A., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust, and H. Blom.** 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *J. General Microbiol.* 138: 2715–2720.
- Holck, A. L., L. Axelsson, K. Huhne, and L. Krockel.** 1994. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 143–149.
- Holo, H., Ø. Nilssen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich, and J. M. Monfort.** 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Microbiol.* 79: 322–330.

- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel, and C. M. Franz. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 730–739.
- Huss, H. H., L. V. Jørgensen, and B. F. Vogel. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 267–274.
- Ingham, A., M. Ford, R. J. Moore, and M. Tizard. 2003. The bacteriocin piscicollin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1365–1371.
- Jiménez-Díaz, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba, and J. C. Piard. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416–1424.
- Johnsen, L., G. Fimland, and J. Nissen-Meyer. 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Jørgensen, L. V. and H. H. Huss. 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 127–131.
- Kaiser, A. L. and T. J. Montville. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4529–4535.
- Katikou, P., I. Ambrosiadis, D. Georgantelis, P. Koidis, and S. A. Georgakis. 2005. Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances' producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1303–1313.
- Katla, T., T. Møretrø, I. M. Aasen, A. Holck, L. Axelsson, and K. Naterstad. 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18: 431–439.
- Katla, T., K. Naterstad, M. Vancanneyt, J. Swings, and L. Axelsson. 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin a, pediocin PA-1, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4431–4437.
- Kazazic, M., J. Nissen-Meyer, and G. Fimland. 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specific of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148: 2019–2027.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–85.
- Klare, I., C. Konstabel, S. Muller-Bertling, R. Reissbrodt, G. Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, H. Goossens, and W. Witte. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8982–8986.
- Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers, and W. M. de Vos. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895–904.
- Kleerebezem, M., P. Hols, E. Bernard, T. Rolain, M. Zhou, R. J. Siezen, and P. A. Bron. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 199–230.
- Lee, J., J. Jang, B. Kim, J. Kim, G. Jeong, and H. Han. 2004. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis. *J. Microbiol. Methods* 59: 1–6.

- Leroy, F and L. de Vuyst.** 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 141–152.
- Line, J. E., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, B. S. Seal, G. R. Siragusa, and N. J. Stern.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1094–1100.
- Lorenzo, J. M., M. C. Garcia-Fontán, A. Cachaldora, I. Franco, and J. Carballo.** 2010. Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacon (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiol.* 27: 229–235.
- Lunden, J., R. Tolvanen, and H. Korkeala.** 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J. Dairy Sci.* 87: E6–E12.
- Lyhs, U., J. Björkroth, and H. Korkeala.** 1999. Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 77–84.
- Lyhs, U.** 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Ph.D. Thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Lyhs, U., H. Korkeala, and J. Björkroth.** 2002. Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 147–153.
- Lyhs, U. and J. K. Björkroth.** 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.* 25: 529–533.
- Makino S., K. Kawamoto, K. Takeshi, Y. Okada, M. Yamasaki, S. Yamamoto, and S. Igimi.** 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 189–196.
- Marugg, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebor, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. Zoetmulder, and P. A. Vandenberg.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2360–2367.
- Mathiesen, G., K. Gene, L. Kroeckel, L. Axelsson, and V. G. H. Eijlsink.** 2005. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translation coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3565–74.
- McLeod, A., M. Zagorec, M. C. Champomier-Verges, K. Naterstad, and L. Axelsson.** 2010. Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. *BMC Microbiol.* 10: 120.
- Miettinen, M. K., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. J. Björkroth, and H. J. Korkeala.** 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2358–2360.
- Miettinen, H.** 2006. *Listeria monocytogenes* in fish farming and processing. Academic dissertation. Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Miller, K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu, and B. Ray.** 1998. Isolation and characterization of pediocin ACh chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1997–2005.
- Moreira, W. L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Moretro, T., K. Naterstad, E. Wang, I. M. Aasen, S. Chaillou, M. Zagorec, and L. Axelsson.** 2005. Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156: 949–960.

- Najjari, A., H. Ouzari, A. Boudabous, and M. Zagorec. 2008. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 342–351.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F. and V. G. H. Eijsink. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: “*Cell-cell signalling in bacteria*”, pp. 175–192. Dunny, G. M. and S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., WA, USA.
- Nes, I. F. and H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 55: 50–61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegård, H. S. Haugen, and P. E. Kristiansen. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 19–37.
- Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H. S. Haugen, and P. E. Kristiansen. 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2: 52–60.
- Nørrung, B., J. K. Andersen, and J. Schlundt. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 195–203.
- Oppegård, C., P. Rogne, L. Emanuelson, P. E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210–219.
- O'Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Papathanasopoulos, M. A., F. Krier, A. M. Revol-Junelles, G. Lefebvre, J. P. Le Caer, A. von Holy, and J. W. Hastings. 1997. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains. *Curr. Microbiol.* 35: 331–335.
- Prins, W. A., M. Botha, M. Botes, M. de Kwaadsteniet, A. Endo, and L. M. Dicks. 2010. *Lactobacillus plantarum* 24, isolated from the marula fruit (*Sclerocarya birrea*), has probiotic properties and harbors genes encoding the production of three bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 61: 584–589.
- Quadri, L. E., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269: 12204–12211.
- Rantsiou, K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi, and L. Cocolin. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1977–1986.
- Revol-Junelles, A. M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour, and G. Lefebvre. 1996. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 120–124.
- Rihakova, J., V. W. Petit, K. Demnerova, H. Prevost, S. Rebuffat, and D. Drider. 2009. Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1811–1819.
- Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7: 192–202.

- Rocourt, J., C. Jacquet, and A. Reilly.** 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 197–209.
- Rocourt, J., A. Hogue, H. Toyofuku, C. Jacquet, and J. Schlundt.** 2001. *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am. J. Infect. Control* 29: 225–227.
- Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Rørvik, L. M.** 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 183–190.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen, and A. Jarvinen.** 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.* 42: e35–44.
- Samelis, J., S. Roller, and J. Metaxopoulos.** 1994. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 475–486.
- Sanders, M. E.** 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61: 91–99.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
- Serhan, M., C. Cailliez-Grimal, F. Borges, A. M. Revol-Junelles, C. Hosri, and J. Fanni.** 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26: 645–652.
- Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J. M. Berjeaud.** 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6416–6420.
- Skaugen, M., C. I. Abildgaard, and I. F. Nes.** 1997. Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Mol. Gen. Genet.* 253: 674–686.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodríguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernández, B. Sanz, and P. E. Hernández.** 1992. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 215–225.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Sudirman, I., F. Mathieu, M. Michel, and G. Lefebvre.** 1993. Detection and properties of curvacin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Curr. Microbiol.* 27: 35–40.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Benech, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet, and I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.
- Tannock, G. W.** 2004. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3189–3194.
- Tham, W., H. Ericsson, S. Loncarevic, H. Unnerstad, and M. L. Danielsson-Tham.** 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food. Microbiol.* 62: 173–175.

- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1993. Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch. Microbiol.* 160: 279–283.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1994. Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology* 140: 361–367.
- Todorov, S. D., C. Rachman, A. Fourrier, L. M. Dicks, C. A. van Reenen, H. Prevost, and X. Dousset.** 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* 17: 23–31.
- Työppönen, S., E. Petaja, and T. Mattila-Sandholm.** 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 233–244.
- Urso, R., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi, and L. Cocolin.** 2006. Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 480–485.
- Uteng, M., H. H. Hauge, P. R. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer, and C. Muhle-Goll.** 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417–11426.
- van Belkum, M. J., B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok, and G. Venema.** 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1187–1191.
- van Belkum, M. J. and M. E. Stiles.** 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17: 323–335.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijsink, T. F. O’Sullivan, K. O’Hanlon, and D. van Sinderen.** 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., V. G. Eijsink, and D. Van Sinderen.** 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194–7203.
- Vaughan, A., J. O’Mahony, V. G. Eijsink, M. O’Connell-Motherway, and D. van Sinderen.** 2004. Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 377–384.
- Vaughan, E. E., H. G. Heilig, K. Ben-Amor, and W. M. de Vos.** 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 477–490.
- Vogel, R. F., M. Lohmann, M. Nguyen, A. N. Weller, and W. P. Hammes.** 1993. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lact. sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 295–300.
- WHO (World Health Organization).** 1988. Foodborne listeriosis. Report of the WHO Working Group. *Bulletin of the World Health Organization* 66: 421–428.
- Xiraphi, N., M. Georgalaki, G. V. Driessche, B. Devreese, J. V. Beeumen, E. Tsakalidou, J. Metaxopoulos, and E. H. Drosinos.** 2006. Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 19–26.
- Zhou, J. S., C. J. Pillidge, P. K. Gopal, and H. S. Gill.** 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 211–217.

CAPÍTULO V

Bioconservación del pescado fresco, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus boscii*), utilizando bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino

CHAPTER V

Biopreservation of fresh fish, young hake (Merluccius merluccius) and megrim (Lepidorhombus boscii), using bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria of marine origin

V.1. ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are the most commonly used microorganisms to ensure food safety, preserve food value and improve the nutritional quality and/or organoleptic characteristics of fish. In this work we describe the development of a biopreservation strategy for fresh landed fish based on the use of bacteriocinogenic LAB of marine origin. For this purpose, two multiple bacteriocin-producing LAB strains, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35 and *Enterococcus faecium* BNM58, previously isolated from fish, seafood and fish products (Chapter III) were selected due to their capability to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* and several fish-spoilage microorganisms of relevance for the food industry such as *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*. Two commercially important fish species were chosen for this study, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boschii*), and the specimens were acquired at the Marín (Pontevedra, Spain) retail fish market, after one night in the chilled hold of a near-shore fishing vessel. The biopreservation potential and the application strategies of these two multibacteriocinogenic LAB strains were first tested at a laboratory scale, where several batches of fresh fish were inoculated with: (i) the multibacteriocinogenic LAB culture(s) as protective culture(s); and/or (ii) their cell-free culture supernatant(s) as food ingredient(s), and (iii) the lyophilized bacteriocin preparation(s) as lyophilized food ingredient(s). All batches were stored in polystyrene boxes, permanently filled with ice at 0–2°C, for 14 days. Microbiological analyses, including counts of aerobic mesophiles, standard coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., coagulase-positive staphylococci, *Clostridium* spp. and *Listeria* spp., as well as sensorial analyses including general appearance, skin (slime), gills color and odor, eye morphology and peritoneum adherence, were carried out during the biopreservation trials. Subsequently, *Lb. curvatus* BCS35 was selected to up-scale the trials, and combinations of the three application methods were assayed. For this purpose, this multibacteriocinogenic strain was grown in a semi-industrial scale fermentor in modified MRS broth, and three batches of fresh landed fish were inoculated with the resulting protective culture and/or food ingredient, and stored on ice in a chilled chamber at 0–2°C at the Marín retail fish market for 14 days. Microbiological analyses cited above were carried out during the storage period, showing that when *Lb. curvatus* BCS35 culture or the corresponding cell-free culture supernatant was used as protective culture or food ingredient, respectively, bacterial counts were significantly lower than those of the control batches, both for young hake and megrim. Moreover, the presence of *Listeria* spp. in megrim was inhibited in both analyses. Finally, the effect of protective culture or food ingredient on the sensory characteristics of fish was evaluated by an official fish appraiser from the Marín retail fish market, who concluded that all the biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than the respective control batches, demonstrating that the multibacteriocinogenic strain of marine origin *Lb. curvatus* BCS35 may be considered as a suitable candidate for its application as fresh landed fish biopreservative.

V.2. INTRODUCTION

Since the beginning of time, fish has served mankind as a highly nutritious and readily available source of food. Fresh fish is, however, an extremely perishable food compared to other food commodities, partly because the considerable distance existing between harvesting areas and consumers. Moreover, the time elapsing between catching and landing fish is often much longer than that between landing and selling in the shop, and consequently fishermen bear much of the responsibility for the state of freshness in which fish reaches the consumer (Graham *et al.*, 1992). This issue is of special importance in fisheries distant from the fleet base port, as it happens in Galicia (Spain), a region with a strong fishing industry that targets mostly the Sole Bank. In this respect, the Galician fishing fleet is one of the most important European fleets among those fishing in European community waters (Fernández-Macho *et al.*, 2004). The long periods of time during fish transportation provide abundant opportunities for microbial growth and cross-contamination from different sources, making it more difficult to maintain the hygienic quality required for fish and seafood (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998b). The loss of quality of fresh fish and therefore the reduction of its market value is strongly correlated with the decrease of its hygienic-sanitary conditions. Fish post-harvest losses are significant, especially in developing countries, which account for around 10% of global capture and cultured fish (10–12 million tons) (FAO, 2005-2011a). Therefore, understanding the post-harvest changes that occur in fish is very important when developing appropriate measures to reduce losses and preserve the quality and safety of the finished products. The fish species selected for this study, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*), are amongst the most commercially important species in Galicia. They are caught in the Sole Bank and the time passed since the fish from the first haul is refrigerated and stored in the hold of the vessel until it is sold in the retail fish market is about 12–14 days. Consequently, the capture obtained in the first few days of each tide reaches considerably lower prices than individuals caught in the last days of the tide (Xunta de Galicia, 2008; Vázquez-Rowe *et al.*, 2011a). The preservation of fish during this period of time is a major concern to fishermen, since products brought to market in well preserved conditions will generally achieve higher prices, and thus give better returns to the fish industry.

The stress and mechanical damage caused during capture, the structure and composition of fish, its pH, and the storage temperature prior to landing are all factors that influence the fish spoilage rate (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998b; Leroi, 2010). Immediately after capture, several chemical and biological changes take place in dead fish, which can ultimately lead to rejection for human consumption because of its spoilage, which is the result of a whole series of complicated changes brought about by the own fish enzymes, chemical action and bacteria. In this respect, the most dramatic change is the onset of *rigor mortis*. Immediately after death, the muscle is totally relaxed and the limp elastic texture usually persists for some hours, whereafter the muscle contracts. This condition usually lasts for a day or more and then rigor resolves, making the muscle relax again, but no longer being as elastic as before (Hobbs, 1982; Huss, 1995). During the *post mortem* state, the initial stages of spoilage in fish are fundamentally characterized by the loss of characteristic odor and taste, and are

mainly due to autolytic degradation (Hobbs, 1982; Graham *et al.*, 1992; Huss, 1995). The enzymes present in the flesh and various organs of the fish at death can continue being active, resulting in the breakdown of many components of the tissues. The most noticeable autolytic change in the early stages of fish spoilage is the bursting of the belly walls of ungutted fish, especially during feeding periods where the concentration of digestive enzymes in the gut is high, being then able to digest the gut walls and the surrounding tissues. This effect can be reduced by keeping the fish cool and processing it quickly. Most fish, apart from the small pelagic species, are gutted soon after catching, and therefore free from this problem, if stored and iced correctly. The final stages of fish quality deterioration are characterized by softening or toughening of flesh texture and production of unpleasant smelling odors and flavors, mainly due to microbial activity (Hobbs, 1982; Graham *et al.*, 1992; Huss, 1995; Fraser and Sumar, 1998b). In a living healthy fish, bacteria are present in the surface slime, the gills and the intestines without causing any harm because the natural resistance of a healthy fish keeps them at bay. However, soon after the fish dies, bacteria begin to invade the tissues through the gills, along blood vessels, and directly through the skin and the lining of the belly cavity (Hobbs, 1982; Graham *et al.*, 1992). The changes brought about by catching, handling and processing will determine which types of bacteria continue to grow. In addition, handling and processing will remove or kill some bacteria, but also add other to the fish. Some of the bacteria added in processing operations will be of the same type as those originally present, while others will be different and may include some that can cause food poisoning (Hobbs, 1982). Fish flesh contains a low percentage of carbohydrates (0.2–1.5%, depending on the fish species), and high levels of moisture and nutrients that include free amino acids, non-protein low molecular weight nitrogenous compounds (*e.g.*, creatine, nucleotides, urea and trimethylamine oxide [TMA-O]), and digestible proteins that are rapidly metabolized by the bacteria (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998b; Leroi, 2010). The decomposition of the sulphur-containing amino acids cysteine and methionine is particularly important in spoilage, as it causes off-odors and -flavors due to the formation of hydrogen sulphides and methylmercaptane, respectively (Herbert and Shewan, 1975, 1976; Gram and Huss, 1996).

As a general rule, the undesirable effects cited above occur more rapidly at high temperatures, and consequently lowering the temperature either by chilling or freezing is the most important single measure that can be taken to slow down the deterioration of fish (Hobbs, 1982; Huss 1995). In this respect, fish must be chilled quickly and kept chilled uninterrupted during its storage and distribution (Hobbs, 1982; Kelman, 1982; Graham *et al.*, 1992; Huss, 1995; Shawyer and Medina, 2005). The faster a lower temperature is attained during fish chilling, the more effectively the spoilage activity is inhibited. The most common means of chilling is by the use of ice, although other means such as chilled seawater (CSW), ice slurries (of both seawater and freshwater), and refrigerated seawater (RSW) (Kelman, 1982; Graham *et al.*, 1992; Shawyer and Medina, 2005; Cakli *et al.*, 2006) are also frequently used. The chilling techniques, where temperature is reduced to that of melting ice (0°C), effectively prolongs the length of fishing trips and makes it possible to increase the catch with the subsequent economic benefits for the vessel and the crew. Additional ways to delay deterioration are care and cleanliness in fish handling. Care in handling is essential because unnecessary damage can

provide access for the spoilage bacteria through cuts and wounds, thus hastening their effect on the flesh. Cleanliness is important in two ways: (i) the natural sources of bacteria can largely be removed soon after the fish is captured by taking out the guts and washing off the slime from the surface of the fish, and (ii) the chances of contamination can be kept to a minimum by ensuring the fish is always handled in a hygienic manner.

Fish freshness is an important factor when determining whether the fish meat is edible or not, or in considering other possible uses (such as fishmeal or fish oil). The sensory evaluation of raw fish in markets and landing sites is done by assessing the appearance, texture and odor. Generally, the quality deterioration of fresh fish is characterized by its smell and the initial loss of fresh fish flavor. After a period where the odor and flavor are described as neutral or non-specific, off-odors and -flavors are detectable, which progressively become more pronounced and lead to rejection of the fish. The time to spoilage depends mainly on fish species and storage temperatures (Huss, 1995; Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998a). Traditionally, several factors have been used to determine fish freshness, including visual inspection of the gills color and shine, skin color and texture, slime color and thickness, and smell and flesh texture. Moreover, freshness can also be assessed by chemical and microbiological analyses. With regard to this, the determination of fish spoilage by chemical analysis is based on the products resulting from the breakdown of both the macro-components (fats and proteins) and the micro-components (nucleotides, non-protein low molecular weight nitrogenous compounds, enzymes, etc.) present in the fish (Fraser and Sumar, 1998a).

The attempts for controlling the growth of microbiota causing fish spoilage have been fundamentally centered, apart from the action of cold, on the use of modified atmospheres. Nevertheless, this technology has not been widely implemented in this field as it involves a significant and costly transformation of the ship holds that may restrict the uses that, for example, the Galician outfitters had foreseen for their ships. Moreover, biopreservation technology, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety by using microorganisms and/or their metabolites (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002), rises as an interesting and cost-effective alternative. In the last years, biopreservation strategies are gaining increasing attention to ensure food quality and safety, especially within the current context of an overgrowing demand for minimally processed food products. However, biopreservation technology must be combined with different hurdles (refrigeration, vacuum-packing, salting, etc) to become a viable alternative. In this respect, Lactic Acid Bacteria (LAB) may be considered as biopreservative agents since they produce a wide range of antimicrobial metabolites such as organic acids, diacetyl, acetoin, and hydrogen peroxide, but mainly because of the production of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Cotter *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006). Moreover, for the development of biopreservation strategies for fish and fish products it is preferable to employ suitable LAB strains isolated from marine species, since the strains already acclimatized to a seafood habitat would be advantageous in terms of biopreservation (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009). The application of bacteriocins and bacteriocin-producing LAB strains as part of a hurdle technology

for food preservation has received great attention in recent years (Cleveland *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003; Ross *et al.*, 2003; Brillet *et al.*, 2005; Ringø *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008), since the combination of bacteriocins with other barriers has proved to be an effective antimicrobial strategy (Leistner, 2000; Modi *et al.*, 2000; Garriga *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Uhart *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009). Furthermore, most LAB species have a long history of safe human exposure, and therefore have been proposed by the European Food Safety Authority (EFSA) for the Qualified Presumption of Safety (QPS) status (EFSA 2005a, 2005b; EFSA 2007; EFSA 2011), geared to ensure the safety of microorganisms used in food and feed. In this respect, there are four main general strategies to use bacteriocins as food biopreservatives: (i) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* as a protective and/or starter culture; (ii) use of a substrate previously fermented by a bacteriocin-producing strain as a food ingredient; (iii) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, and/or (iv) incorporation or immobilization of the bacteriocin in or onto packaging materials for development of bioactive food packaging (Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). In a previous work (Chapter III) we described the antimicrobial spectrum of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35 and *Enterococcus faecium* BNM58, isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) and albacore (*Thunnus alalunga*), respectively, and selected them from a total of 25 bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) LAB strains because of their broad and strong antimicrobial spectrum against spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*. Moreover, the biotechnological potential and *in vitro* safety evaluation of *Lb. curvatus* BCS35 was assessed in a previous work (Chapter IV). The aim of the work described herein was to examine the biopreservative effect of these two multibacteriocinogenic LAB strains and/or their antimicrobial metabolites (*i.e.*, bacteriocins) by using several application strategies to improve the microbiological and sensory quality of fresh landed fish of high economical relevance, namely young hake (*M. merluccius*) and megrim (*L. boscii*).

V.3. MATERIALS AND METHODS

V.3.1. Bacterial strains and culture conditions

For the biopreservation studies of fresh landed fish, two multibacteriocinogenic LAB strains of marine origin were selected, namely *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58, previously isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) and albacore (*Thunnus alalunga*) muscle, respectively (Chapter III). *E. faecium* BNM58 harbors the genetic determinants encoding enterocin L50 [EntL50 (EntL50A and EntL50B)], enterocin P (EntP) and enterocin Q (EntQ) (Chapter III), while *Lb. curvatus* BCS35 was shown to produce, at least, curvacin G14 (CurG14) (sakacin P [SakP] variant), curvacin G15 (CurG15) (sakacin X [SakX]), and, probably, sakacin T (SakT [SakT_α and SakT_β]) and sakacin Q (SakQ) (Chapter IV). LAB strains were stored at -80 and -20°C with 15% (vol/vol) of sterile glycerol as criopreservative.

In the first part of the study at a laboratory scale (lab-scale), *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58 were grown in de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Scharlau, Barcelona, Spain) at 30°C for 16 h with moderate agitation (120 rpm) in an orbital shaker (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Cultures (aprox., 1×10^9 ufc/ml) were then divided into three fractions: (i) culture fractions were taken, supplemented with 3% (wt/vol) NaCl, and refrigerated until use as protective cultures; (ii) cell-free culture supernatants were obtained by culture centrifugation (12,000 rpm, 4°C, 10 min), supplemented with 3% (wt/vol) NaCl, and kept at -20°C until use as food ingredients, and (iii) aliquots of cell-free culture supernatants were frozen at -40°C, lyophilized with a Dura Dry II MP apparatus (Kinetics Group Inc., USA), supplemented with 3% (wt/wt) NaCl, and stored at room temperature until use as lyophilized food ingredients.

In the second part of the study at a semi-industrial scale, *Lb. curvatus* BCS35 was grown in home-made modified MRS broth (100 l) at 30°C for 16–18 h in a 180 l fermentor (Innaves S. A., Spain), with pH control (between 6.0 and 6.4) and moderate agitation (120 rpm). The protective culture, food ingredient and lyophilized food ingredient were obtained as described above, except that centrifugation was performed in a Westfalia separator Mod. OTC 3-02-1337 (GEA Westfalia Separator Iberica S. A., Spain).

In both studies, cultures were analyzed for total viable counts (TVCs), and food ingredient and lyophilized food ingredient assayed for bacteriocin activity. TVCs were performed by the standard dilution method on MRS agar (Scharlau) after incubation at 37°C for 24–48 h. The bacteriocin activity was measured by an agar-well diffusion test (ADT) as previously described (Cintas *et al.*, 1995) (Chapter III) using *L. monocytogenes* CECT4032 as indicator microorganism.

V.3.2. Fresh fish, batch description and storage conditions

Fresh gutted young hake (*M. merluccius*) and ungutted megrim (*L. boscii*) were acquired at the Marín (Pontevedra, Spain) retail fish market. After being caught, the fish was placed in polystyrene boxes, in two layers separated by a plastic sheet and a layer of crushed ice, and maintained overnight at 0–2°C in the chilled hold of a near-shore fishing vessel. The study was designed to reproduce a fishing trip of 14 days and it was carried out twice.

In the first part of the study at a lab-scale, the fish-containing polystyrene boxes were transported to the laboratory of Innaves S. A. (Pontevedra, Spain) in chilled conditions using crushed ice supplied by the Marin retail fish market. The young hake sample was divided into 8 batches with 16–18 specimens per batch, and the megrim sample divided into 10 batches with 20–25 specimens per batch (Table V.1). For the treatment with the protective cultures, each fish specimen was immersed in the bacterial culture for 5 min. For the application of the food ingredients, each fish specimen was sprayed with or immersed in the corresponding preparation for 5 min. For the treatment with the lyophilized food ingredients, the preparations were homogeneously sprinkled on each specimen, trying to reach the abdominal cavity. Afterwards, fish was placed inside polystyrene boxes, covered with a plastic film and crushed ice, previously sprinkled with the lyophilized food ingredients, and stored at 0–2°C for 14

days (Figs. 5.1 and 5.2). Periodically, each batch was subjected to microbiological analyses and sensory evaluation as described below. The crushed ice use for fish storage was supplied by the Marín retail fish market, in order to reproduce the conditions of the fishing sector. Crushed ice is preferred because it ensures maximum contact and therefore a fast and efficient chilling of newly-caught fish.

Table V.1. Lab-scale biopreservation strategies for fresh landed young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*).

Batch	Description ^a	Preservation technique(s)
Young hake (<i>M. merluccius</i>)		
A	Control	Ice and refrigeration
B	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture	Protective culture, ice and refrigeration
C	Immersion in <i>E. faecium</i> BNM58 culture	Protective culture, ice and refrigeration
D	Immersion in a mixture (1:1) of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58 cultures	Protective culture, ice and refrigeration
E	Spray with a mixture (1:1) of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58 culture supernatants	Food ingredient, ice and refrigeration
F	Sprinkle with a lyophilized culture supernatant of <i>Lb. curvatus</i> BCS35	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
G	Sprinkle with a lyophilized culture supernatant of <i>E. faecium</i> BNM58	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
H	Sprinkle with a mixture (1:1) of lyophilized culture supernatants of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
Megrim (<i>L. boscii</i>)		
A	Control	Ice and refrigeration
B	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture	Protective culture, ice and refrigeration
C	Immersion in <i>E. faecium</i> BNM58 culture	Protective culture, ice and refrigeration
D	Immersion in a mixture (1:1) of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58 cultures	Protective culture, ice and refrigeration
E	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture supernatant	Food ingredient, ice and refrigeration
F	Immersion in <i>E. faecium</i> BNM58 culture supernatant	Food ingredient, ice and refrigeration
G	Immersion in a mixture (1:1) of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58 culture supernatants	Food ingredient, ice and refrigeration
H	Sprinkle with a lyophilized culture supernatant of <i>Lb. curvatus</i> BCS35	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
I	Sprinkle with a lyophilized culture supernatant of <i>E. faecium</i> BNM58	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
J	Sprinkle with a mixture (1:1) of lyophilized culture supernatants of <i>Lb. curvatus</i> BCS35 and <i>E. faecium</i> BNM58	Lyophilized food ingredient, ice and refrigeration

^aCultures, culture supernatants and lyophilized culture supernatants used were supplemented with NaCl (3%, wt/vol or wt/wt).

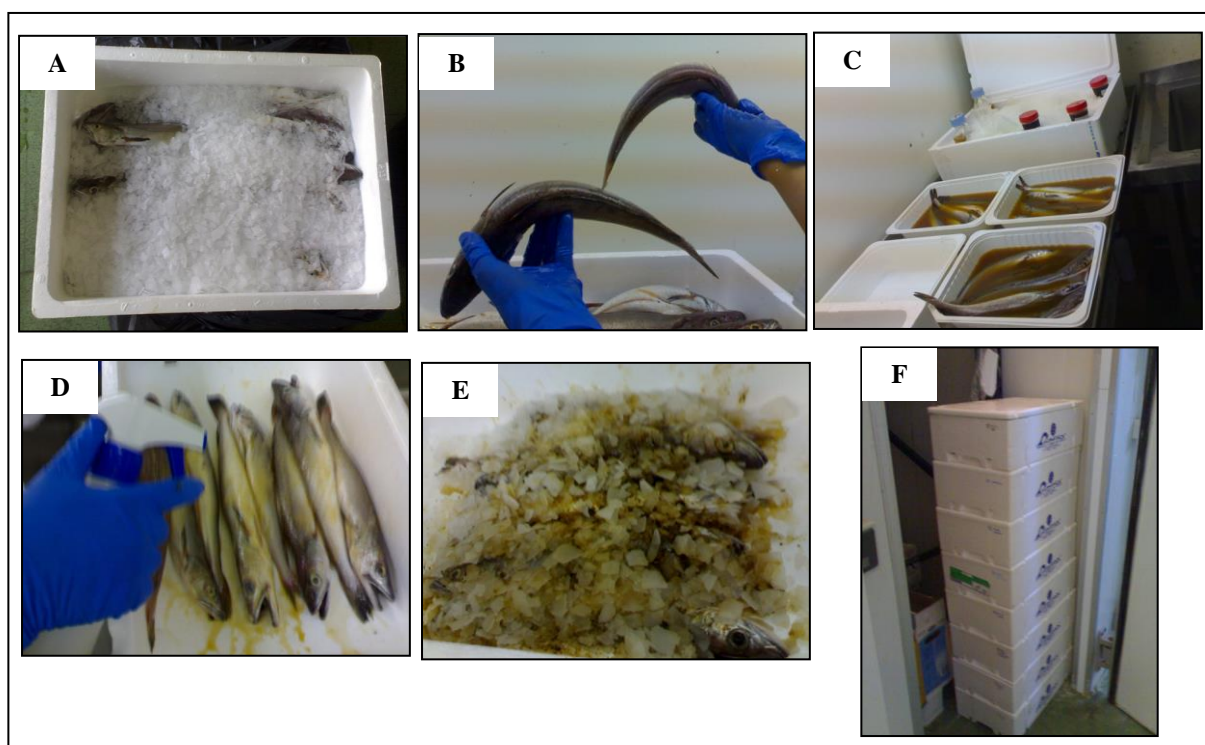


Figure 5.1. Biopreservation of fresh landed young hake (*M. merluccius*) at lab-scale. Reception of fresh landed fish (A); young hake specimens before the onset of rigor mortis (B); immersion of specimens in the culture or the culture supernatant (C); fish spraying with the culture supernatant (D); fish and ice sprinkling with the lyophilized culture supernatant (E), and specimens in boxes and covered with crushed ice for fish storage (F).

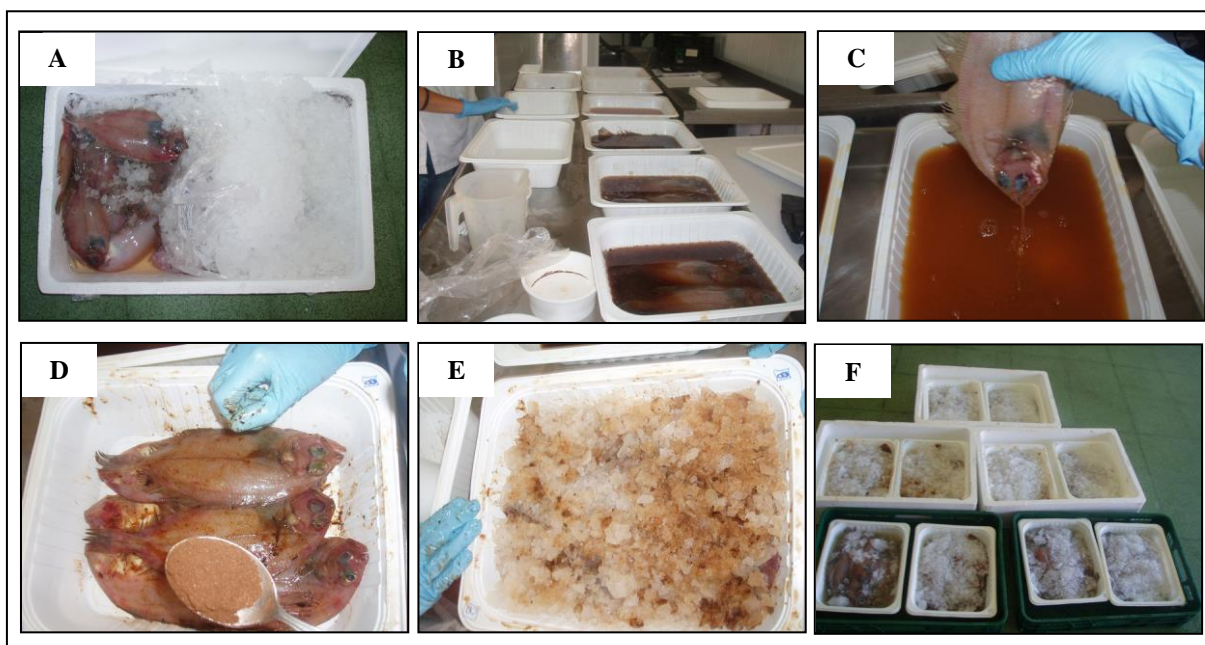


Figure 5.2. Biopreservation of fresh landed megrim (*L. bosci*) at lab-scale. Reception of fresh landed fish (A); immersion of specimens in the culture or the culture supernatant (B and C); fish and ice sprinkling with the lyophilized culture supernatant (D and E), and specimens in boxes covered with crushed ice for fish storage (F).

In the second part of the study at a semi-industrial scale, trials were performed *in situ* at the Marín retail fish market in order to obtain the professional opinion of the market staff. To carry out this trial, we were granted appropriate working and storage space. Both young hake and megrim samples were divided into 4 batches, with 15–20 and 35–40 specimens per batch, respectively (Table V.2; Figs 5.3 and 5.4). The treatments of the fish specimens with the NaCl supplemented *Lb. curvatus* BCS35 culture, culture supernatant or lyophilized culture supernatant, and the fish storage were performed as described above. Periodically, each batch was subjected to microbiological analyses and sensory evaluation as described below.

Table V.2. Semi-industrial scale biopreservation strategies for fresh landed young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*).

Batch	Description ^a	Preservation technique(s)
A	Control	Ice and refrigeration
B	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture	Protective culture, ice and refrigeration
C	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture + lyophilized culture supernatant of <i>Lb. curvatus</i> BCS35	Protective culture, lyophilized food ingredient, ice and refrigeration
D	Immersion in <i>Lb. curvatus</i> BCS35 culture supernatant	Food ingredient, ice and refrigeration

^aCultures and culture supernatants were supplemented with NaCl (3%, wt/vol).

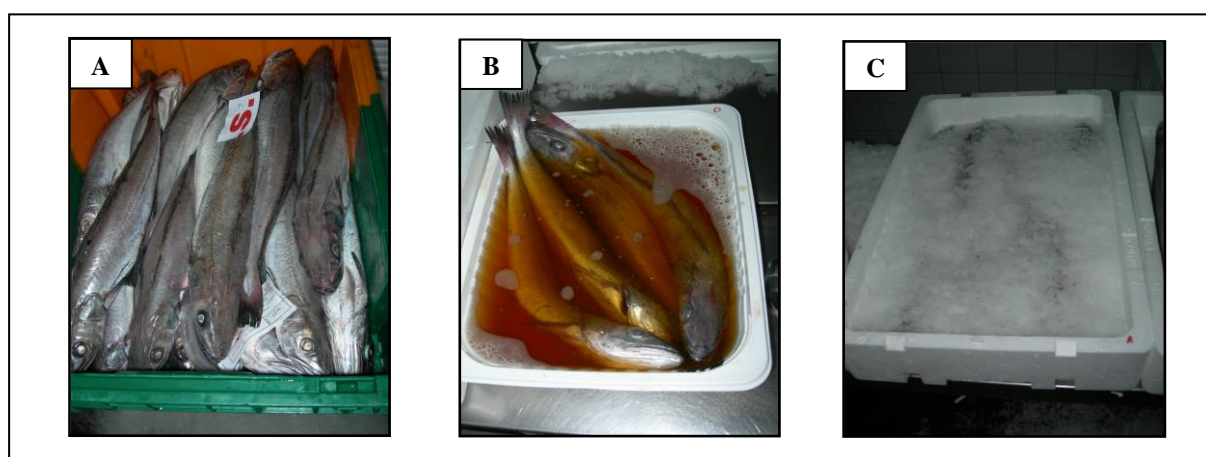


Figure 5.3. Biopreservation of fresh landed young hake (*M. merluccius*) at semi-industrial scale. Reception of fresh landed fish (A); immersion of specimens in *Lb. curvatus* BCS35 culture or culture supernatant (B); specimens in boxes and covered with crushed ice for fish storage (C).

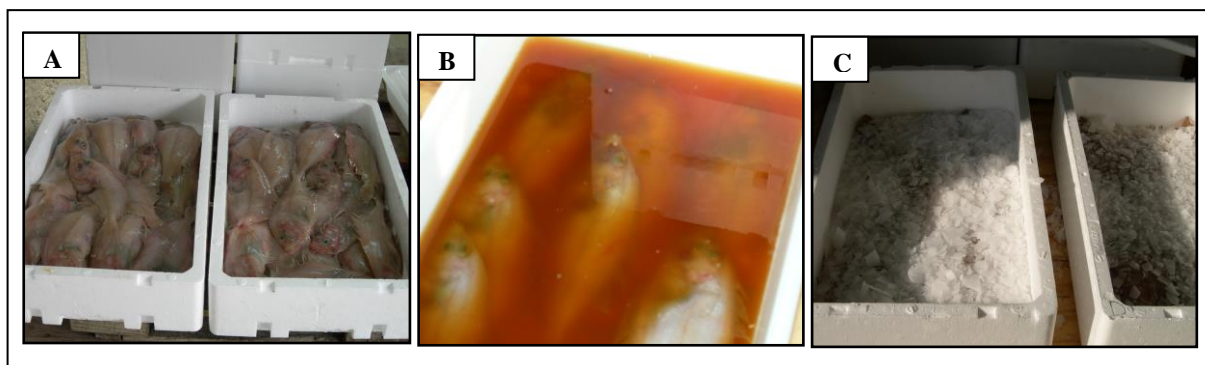


Figure 5.4. Biopreservation of fresh landed megrim (*L. bosci*) at semi-industrial scale. Reception of fresh landed fish (A); immersion of specimens in *Lb. curvatus* BCS35 culture or culture supernatant (B); specimens in boxes and covered with crushed ice for fish storage (C).

V.3.3. Microbiological analyses

Microbiological analyses were carried out on the day of fish arrival to the port ($t=0$), and 7 ($t=7$) and 14 ($t=14$) days after the beginning of the trials. Each fish sample was first treated as follows: the fish was placed in a sterile plastic bag, diluted in chilled buffer peptone water (Pw) (Scharlau) or, when required, the appropriate enrichment medium, and homogenized in a stomacher (Stomacher 400 circulator, Seward, England, UK) for 2 min. After 30 min at room temperature, the homogenate was serially diluted in Pw or the appropriate enrichment medium, and 0.1 or 1 ml of each appropriate dilution was spread-plated or pour-plated, respectively, by duplicate onto the appropriate medium (see below).

For the enumeration of aerobic mesophiles, based on ISO 4833:2003 (Anonymous, 2003a), fish samples (25 g), were homogenized in Pw (225 ml), and appropriate dilutions were pour-plated onto plate count agar (PCA) (Scharlau), and incubated at 30°C for 72 h. Standard coliforms counts were performed based on ISO 4832:1991 (Anonymous, 1991). For this purpose, fish samples (10 g) were homogenized in Pw (90 ml) and serially diluted. Subsequently, each dilution was pour-plated onto violet red bile lactose (VRBL) agar (Scharlau) and incubated at 37°C for 24 h. Typical colonies on VRBL medium are fuchsia and sometimes surrounded by a reddish-fuchsia zone of precipitated bile salts, which reveals lactose degradation to acid. The detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) was performed based on ISO 6888-1:1999 (Anonymous, 1999) using Baird-Parker (BP) agar medium. Fish samples (10 g) were homogenized in Pw (90 ml) and serially diluted. Subsequently, the dilutions were spread-plated onto BP agar plates (Scharlau), and incubated at 37°C for 48 h. The plates were checked after incubation for 24 and 48 h. The morphology of typical colonies in BP of coagulase-positive *St. aureus* is black, shiny, convex with regular margins, surrounded by a clear zone of lipolysis, and after 48 h wide opaque zones of precipitate extending into the cleared medium may occur. For the detection and enumeration of anaerobic sulfite-reducing clostridia, fish samples (10 g) were homogenized in Pw (90 ml) and appropriate dilutions were pour-plated onto sulfite polymyxin sulfadiazine (SPS) agar (Scharlau). Plates were incubated anaerobically at 35°C for 24–36 h. *Clostridium perfringens* produces black

colonies due to the reduction of the sulfite to sulfide, which reacts with the iron from ferric citrate present in the medium to form a black iron sulfide precipitate. For the detection of *Escherichia coli*, fish samples (25 g) were homogenized in Enrichment *Enterobacteriaceae* (EE) broth (Scharlau) (225 ml), and the mixture was incubated at 37°C for 20 h. After incubation, a loopful (10 µl) was streaked onto violet red bile dextrose (VRBD) agar (Scharlau) supplemented with 4-Methyl-Umbeliferil-β-D-Glucuronide (MUG), (Scharlau) and incubated at 35°C for 24 h. The detection of *E. coli* with MUG is based on the ability of β-glucuronidase, an enzyme produced by most *E. coli* strains, to hydrolyze MUG, yielding a fluorescent end product. Typical colonies of *E. coli* show blue-green fluorescence under 365 nm UV light. Detection of *Salmonella* spp. was performed according to ISO 6579:2003 (Anonymous, 2003b), which is the internationally accepted traditional culture method to detect *Salmonella* spp. in foodstuffs. Samples (25 g) were added to Pw (225 ml) and, after being mixed in the stomacher, incubated at 37°C for 18–20 h. Subsequently, an aliquot (0.1 ml) of the pre-enrichment Pw culture was inoculated into Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment broth (Scharlau) (10 ml) and incubated at 41°C for 24 h. Afterwards, a loopful (10 µl) was streaked onto plates of xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Scharlau) and *Salmonella-Shigella* (SS) agar (Scharlau) and incubated at 37°C for 24 h. The methodology based on ISO 11290-1:1996 (Anonymous, 1996) was used to isolate *Listeria* spp. from fish samples. Each sample (10 g) was homogenized in Fraser broth (Scharlau) (90 ml), and the mixture was incubated at 37°C for 24 h. An aliquot (0.1 ml) was transferred to Fraser broth (10 ml) and incubated at 37°C for 48 h. Then, a loopful (10 µl) was streaked onto Palcam agar and examined after of incubation at 37°C for 24 and 48 h. *Listeria* spp. colonies are green-grey in colour with a black core and halo.

V.3.4. Sensory evaluation

As described above for microbiological analyses, single-blind sensory evaluation was also carried out on the day of fish arrival to the market (t=0), and 7 (t=7) and 14 (t=14) days after the beginning of the trials. In the first part of the study at a lab-scale, the method used was a quantitative descriptive analysis with conventional profiling, performed by an internal trained panel of four employees from Innaves S. A., previously trained in fish quality assessment. Panelists were required to make a comparative evaluation of the products by scoring each descriptor on an unstructured line scale from 0 (low intensity) to 10 (high intensity). The most relevant and discriminative descriptors of fresh fish were: general appearance (0=bad; 10=good), skin (slime) (0=milky; 10=transparent), gill color (0=brown; 10=light red), gill odor (0=ammoniac; 10=seaweed), eye (0=concave; 10=convex), peritoneum (0=dislodged; 10=adhered) (this descriptor was only used for gutted fish), bone-meat adherence (0=no; 10=yes), meat texture (0=pasty; 10=firm), meat color (0=muted; 10=brilliant), and meat odor (0=ammoniac; 10=seaweed).

In the second part of the study at a semi-industrial scale, a single-blind sensory evaluation was carried out in the retail fish market of Marín by a professional fish appraiser, who is in charge of fixing the price for landed fish in this market. The fish appraiser was asked to grade all batches from best to

worse according to general appearance, skin (slime), gills color, eye morphology, peritoneum adherence, meat texture and meat odor.

V.4. RESULTS

V.4.1. Effect of the application strategies of bacteriocinogenic LAB of marine origin on the microbiological and sensory quality of fresh landed young hake and megrim during refrigeration storage

V.4.1.1. Microbiological determinations

Microbiota of young hake determined just after reception ($t=0$) was found to be 1.8×10^4 cfu/g for mesophiles, 3.0×10^2 cfu/g for coliforms, $<1.0 \times 10^2$ cfu/g for *St. aureus*, and $<1.0 \times 10^1$ cfu/g for *Clostridium* spp., while *E. coli*, *Salmonella* spp., and *Listeria* spp. were absent in the samples (Table V.3). After 7 days of storage ($t=7$) mesophilic counts for batches C, B, and D (1.7×10^6 , 4.2×10^6 , and 7.8×10^6 cfu/g, respectively) were lower than for batches A (control batch) and E (1.0×10^7 cfu/g). On the other hand, batches H, F and G reached higher mesophilic counts (2.0×10^7 , 1.0×10^8 , and 1.0×10^8 cfu/g, respectively) than batch A (control batch). Regarding coliform numbers, batch C showed the lowest count (3.0×10^2 cfu/g), followed by batches B and E (1.0×10^4 cfu/g), and batches D and H (1.0×10^5 cfu/g), all of them with lower counts than batches A (control batch), F, and G (5.0×10^5 cfu/g). With regard to *St. aureus* counts for batches B, D, G and H remained equal than at $t=0$ ($<1.0 \times 10^2$ cfu/g), while counts for batches F and E reached lower counts (1.3×10^2 and 2.0×10^2 cfu/g, respectively) than those for batches A (control batch) and C (3.0×10^2 cfu/g). After 14 days of storage ($t=14$), only batches C and D showed slightly lower counts (2.7×10^7 , and 4.1×10^7 cfu/g, respectively) than batch A (control batch) (5.0×10^7 cfu/g) of mesophiles, while the rest of the batches (H, E, F, G and B) showed higher counts (1.0×10^8 , 2.0×10^8 , 2.5×10^8 , 3.0×10^8 , and 3.4×10^8 cfu/g, respectively) than the control batch. Regarding coliforms, counts for batches D and C were lower (1.0×10^5 and 4.0×10^5 cfu/g, respectively) than those for batches A (control batch), B, E, F, G, H (1.0×10^6 cfu/g). For *St. aureus* counts, counts for batches G and H (1.0×10^2 cfu/g), B (1.2×10^2 cfu/g), and D and F (1.0×10^2 cfu/g) were slightly lower than those for batch A (control batch) (3.7×10^2 cfu/g), while batches C and E showed higher counts (4.7×10^2 and 5.0×10^2 cfu/g, respectively). Besides, at $t=14$, the presence of *Listeria* spp. was detected in batch A (control batch). In all batches, counts of *Clostridium* spp. remained <10 cfu/g after 7 and 14 days, and *E. coli* and *Salmonella* spp. were not detected at any time during the trial.

Microbiological analysis of megrim at $t=0$ resulted in 3.5×10^3 cfu/g of mesophiles, $<1.0 \times 10^2$ cfu/g of coliforms, $<1.0 \times 10^2$ cfu/g of *St. aureus*, <10 cfu/g of *Clostridium* spp, and absence of *E. coli*, *Salmonella* spp., and *Listeria* spp. (Table V.4). After 7 days of storage ($t=7$), mesophilic counts for batches C, B, D, and E (1.1×10^5 , 1.4×10^5 , 2.2×10^5 , and 9.6×10^5 cfu/g, respectively) were lower than those for batch A (control batch) (1.1×10^6 cfu/g), while batches G and J reached higher mesophilic counts (1.8×10^6 and 2.0×10^6 cfu/g, respectively) than batch A (control batch), and batches F, H and I

reached similar counts (1.2×10^6 cfu/g) than control batch. Concerning coliforms, batch A (control batch) reached the highest coliform load (1.2×10^4 cfu/g). Batches B, F and H presented lower counts (2.0×10^2 , 3.0×10^2 , and 4.0×10^2 cfu/g, respectively) than those for batches I, D, G, C, and J (1.0×10^3 , 1.6×10^3 , 2.7×10^3 , 3.4×10^3 , and 7.6×10^3 cfu/g, respectively), and batch E counts remained unchanged ($< 1.0 \times 10^2$ cfu/g). After 14 days of storage ($t=14$), counts of mesophiles were very similar, with batches F, E, B, and D showing slightly lower counts (1.1×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , and 3.2×10^8 cfu/g, respectively) than batch A (3.4×10^8 cfu/g), while batches C, G, J, H, and I showed slightly higher counts (3.9×10^8 , 4.1×10^8 , 4.7×10^8 , 5.0×10^8 , and 5.3×10^8 , respectively). Regarding coliforms load, batches B, E, D, C, and F reached lower counts (2.1×10^3 , 2.5×10^3 , 4.9×10^3 and 6.7×10^3 cfu/g, respectively) than batch A (control batch) (3.5×10^4 cfu/g), and batches J, H, G, and I presented higher count (3.9×10^4 , 4.3×10^4 , 5.0×10^4 , and 5.0×10^4 cfu/g, respectively) than control batch. It should be noted that the presence of *Listeria* spp. was detected both after 7 and 14 days only in batch A (control batch). Besides, in all batches counts of *St. aureus* remained $< 1.0 \times 10^2$ cfu/g, and those of *Clostridium* spp. remained < 10 cfu/g at 7 and 14 days, and *E. coli* and *Salmonella* spp. were not detected at any time during the trial.

Tabla V.3. Microbiological analysis of young hake (*M. merluccius*) during the lab-scale biopreservation trials.

Time (days)	Batch	Mesophiles (cfu/g)	Coliforms (cfu/g)	<i>St. aureus</i> (cfu/g)	<i>Clostridium</i> spp. (cfu/g)	<i>E. coli</i> ^a	<i>Salmonella</i> spp. ^a	<i>Listeria</i> spp. ^a
0	A	1.8×10^4	3.0×10^2	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
7	A	1.0×10^7	5.0×10^5	3.0×10^2	< 10	-	-	-
	B	4.2×10^6	1.0×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	C	1.7×10^6	3.0×10^2	3.0×10^2	< 10	-	-	-
	D	7.8×10^6	1.0×10^5	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	E	1.0×10^7	1.0×10^4	2.0×10^2	< 10	-	-	-
	F	1.0×10^8	5.0×10^5	1.3×10^2	< 10	-	-	-
	G	1.0×10^8	5.0×10^5	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	H	2.0×10^7	1.0×10^5	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
14	A	5.0×10^7	1.0×10^6	3.7×10^2	< 10	-	-	+
	B	3.4×10^8	1.0×10^6	1.2×10^2	< 10	-	-	-
	C	2.7×10^7	4.0×10^5	4.7×10^2	< 10	-	-	-
	D	4.1×10^7	1.0×10^5	2.0×10^2	< 10	-	-	-
	E	2.0×10^8	1.0×10^6	5.0×10^2	< 10	-	-	-
	F	2.5×10^8	1.0×10^6	2.0×10^2	< 10	-	-	-
	G	3.0×10^8	1.0×10^6	1.0×10^2	< 10	-	-	-
	H	1.0×10^8	1.0×10^6	1.0×10^2	< 10	-	-	-

^aMicrobiological determinations were based on methods for evaluation of presence (+) or absence (-) in 20 or 25 g of fish sample for *E. coli*, and *Salmonella* spp. and *Listeria* spp., respectively. For batch description see Table V.1.

Table V.4. Microbiological analysis of megrim (*L. boschii*) during the lab-scale biopreservation trials.

Time (days)	Batch	Mesophiles (cfu/g)	Coliforms (cfu/g)	<i>St. aureus</i> (cfu/g)	<i>Clostridium</i> spp. (cfu/g)	<i>E. coli</i> ^a	<i>Salmonella</i> spp. ^a	<i>Listeria</i> spp. ^a
0	A	3.5×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
7	A	1.1×10^6	1.2×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	+
	B	1.4×10^5	2.0×10^2	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	C	1.1×10^5	3.4×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	D	2.2×10^5	1.6×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	E	9.6×10^5	$< 1.0 \times 10^2$	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	F	1.2×10^6	3.0×10^2	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	G	1.8×10^6	2.7×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	H	1.2×10^6	4.0×10^2	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	I	1.2×10^6	1.0×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	J	2.0×10^6	7.6×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
14	A	3.4×10^8	3.5×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	+
	B	2.7×10^8	2.1×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	C	3.9×10^8	6.7×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	D	3.2×10^8	4.9×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	E	2.6×10^8	2.5×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	F	1.1×10^8	8.0×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	G	4.1×10^8	5.0×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	H	5.0×10^8	4.3×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	I	5.3×10^8	5.0×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-
	J	4.7×10^8	3.9×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	< 10	-	-	-

^aMicrobiological determinations were based on methods for evaluation of presence (+) or absence (-) in 20 or 25 g of fish sample for *E. coli*, and *Salmonella* spp. and *Listeria* spp., respectively. For batch description see Table V.1.

V.4.1.2. Sensory evaluation

Sensory profiling analyses were performed weekly on each batch of fish by a well-trained panel from Innaves S. A. At arrival ($t=0$), all descriptors were optimum in batch A (control batch) (Fig. 5.5). After 7 days of storage ($t=7$), sensory qualification of inoculated young hake batches revealed that batches B, C, and D were better than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin (slime), bone-meat adherence, meat texture and meat odor; similar to batch A (control batch) for gills odor, eye and meat color; and worse than batch A (control batch) for gills color and peritoneum adherence descriptors. Batch E was judged better than batch A (control batch) only for skin (slime) and meat color; remained identical for general appearance, gills color, gills odor, bone-meat adherence and meat odor; and inferior than batch A (control batch) for eye morphology, peritoneum adherence and meat texture. Regarding batches F, G and H, none of them was considered better than batch A (control batch) for any of the descriptors. After 14 days of storage ($t=14$), only batches B and D remained better

than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin (slime), gills color, gills odor, eye and meat texture. All other batches remained equal or worse than batch A (control batch) for all the descriptors.

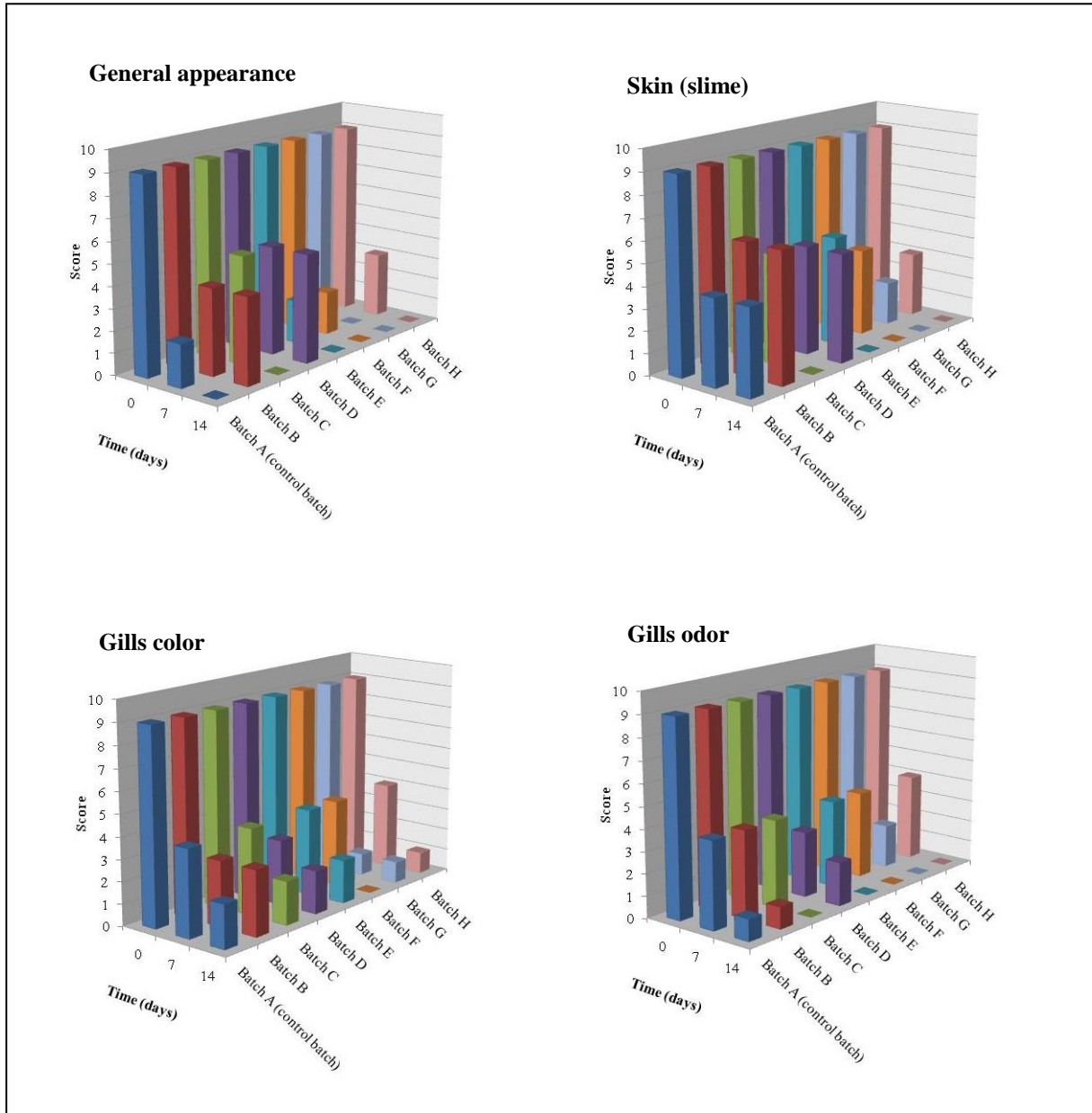


Figure 5.5. Sensory evaluation of young hake (*M. merluccius*) during the lab-scale biopreservation trials. Each descriptor was scored on an unstructured line scale from 0 (low intensity) to 10 (high intensity). The values represented correspond to the average of the scores given by the panelists for each descriptor. For batch description see Table V.1.

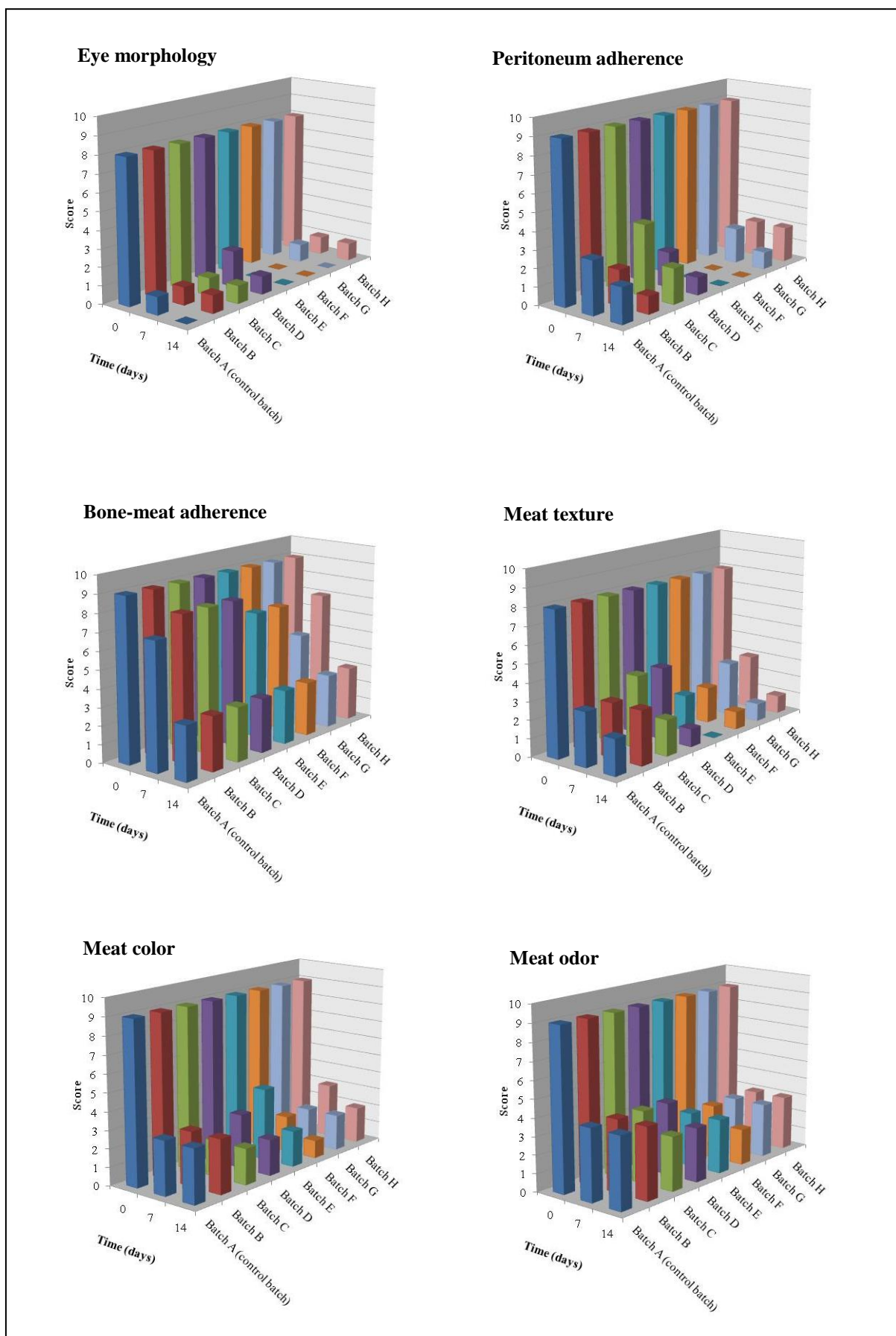


Figure 5.5. Continued.

Sensory evaluation of megrim was also optimum at arrival ($t=0$) (Fig. 5.6), but after 7 days of storage ($t=7$) batches B, C, and D achieved higher scores than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin (slime), gills odor, eye (only batch D), bone-meat adherence (only batch C) and meat texture; similar to batch A (control batch) for gills color, eye (batches B and C), bone-meat adherence (batches B and D), meat color and meat odor; none of them were considered worse than batch A (control batch) for any of the descriptors. Similarly, batches E, F, and G presented higher punctuation than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin (slime), eye (only batch G), and meat texture; remained identical for gills color (batches E and G), gills odor, eye (only batch F), bone-meat adherence, meat color and meat odor; and were worse than batch A (control batch) for gills color (only batch F) and eye (only batch E). Batches H, I and J were better than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin, eye morphology (batches I and J), meat texture (batches H and J); similar to control batch for the descriptors of gills color (batches H and I), gills odor, bone-meat adherence (only batch I), meat texture (only batch I), meat color (only batch I) and meat odor (only batch I); and worse than control batch for the descriptors of gills color (only batch J), eye (only batch H), bone-meat adherence (batches H and J), meat color (batches H and J) and meat odor (batches H and J). After 14 days of storage ($t=14$) all batches were better than batch A (control batch) for the descriptors of general appearance, skin (slime), meat texture and meat color, gills color (except batch I), gills odor (except batch I) and meat odor (except batch I). Interestingly, batch I was the best one for eye morphology descriptor, and all batches were considered similar for bone-meat adherence.

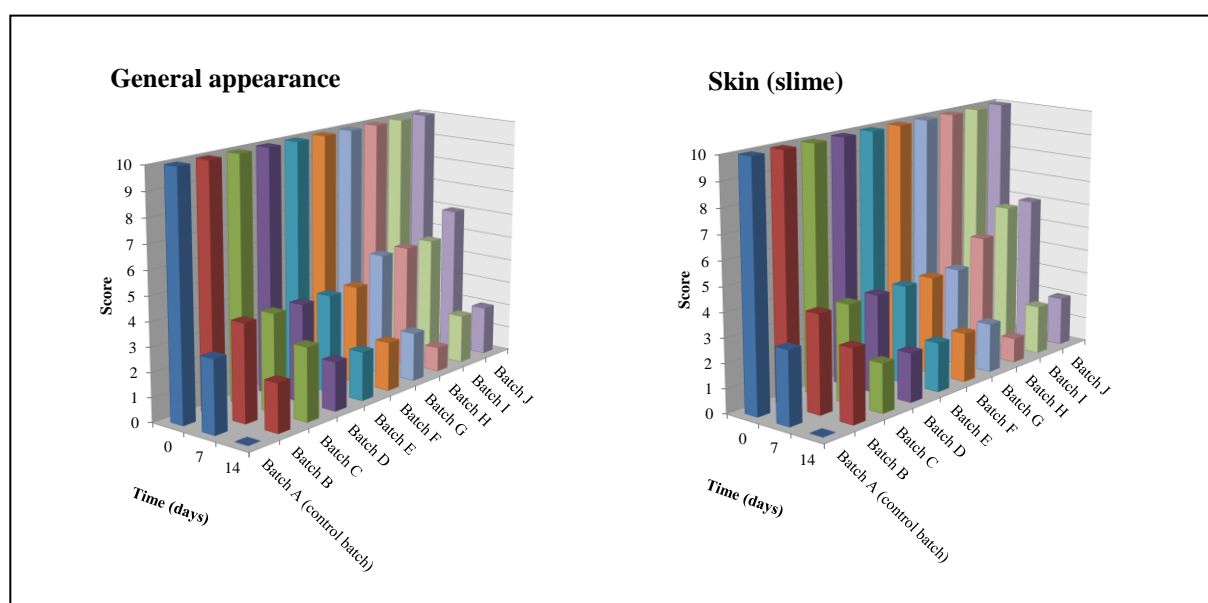


Figure 5.6. Sensory evaluation of megrim (*L. boscii*) during the lab-scale biopreservation trials. Each descriptor was scored on an unstructured line scale from 0 (low intensity) to 10 (high intensity). The values represented correspond to the average of the scores given by the panelists for each descriptor. For batch description see Table V.1.

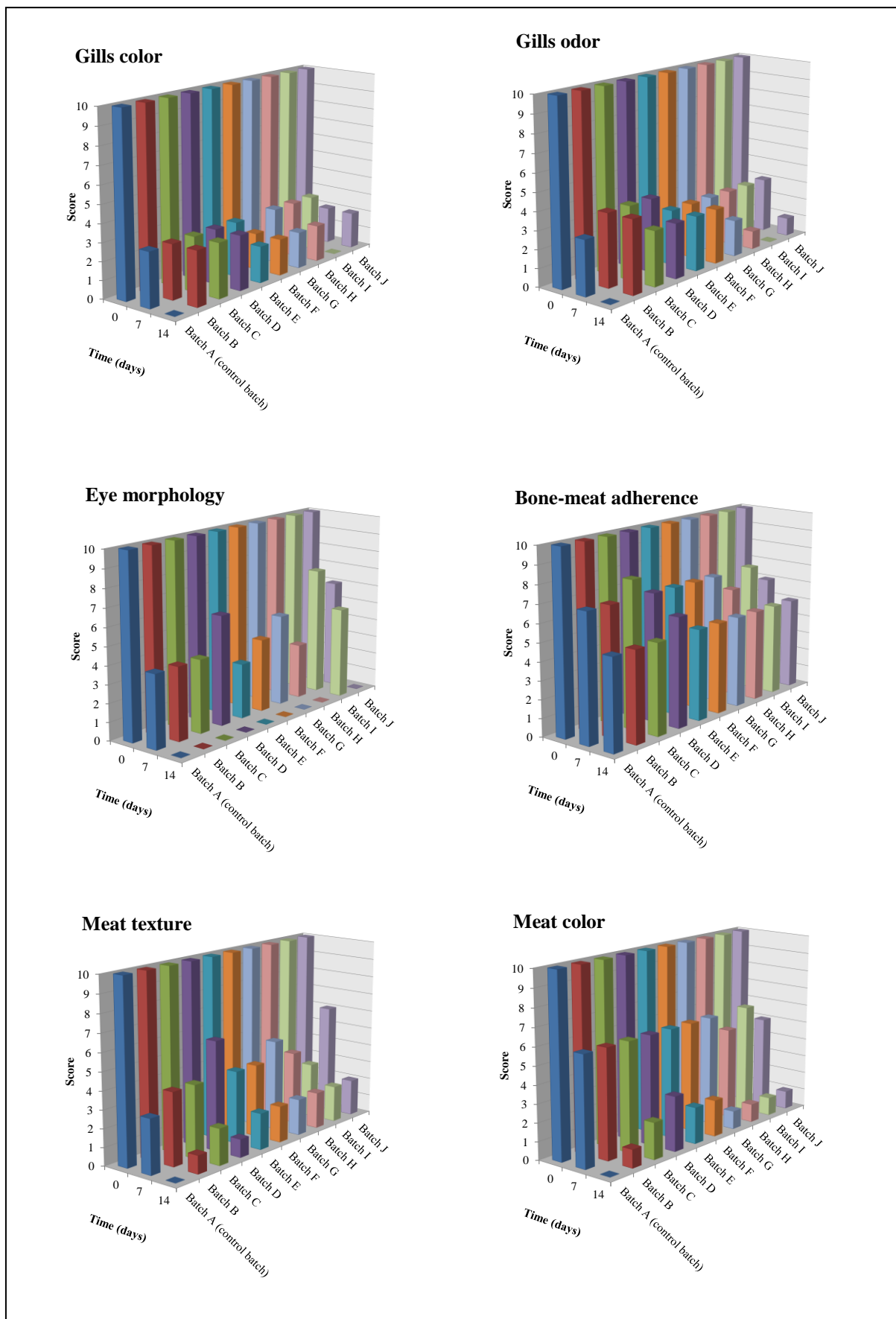


Figure 5.6. Continued.

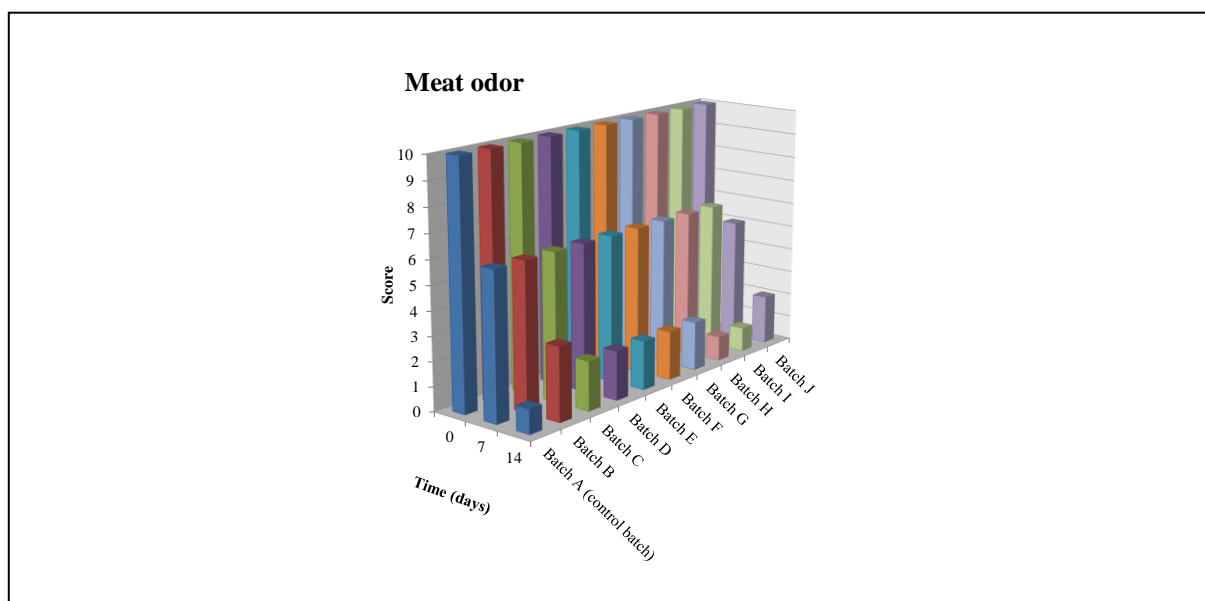


Figure 5.6. Continued.

V.4.2. Biopreservation of fresh landed young hake and megrim with *Lb. curvatus* BCS35

V.4.2.1. Microbiological analyses

Young hake bacterial populations determined just after reception ($t=0$) resulted in 2.1×10^4 cfu/g of mesophiles, 1.0×10^1 cfu/g of coliforms, <10 cfu/g of *St. aureus* and *Clostridium* spp., and absence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. (Table V.5). After 7 days of storage ($t=7$), batch B presented the lowest mesophilic counts (5.0×10^5 cfu/g), followed by batch D (5.5×10^5 cfu/g), then batch C (1.3×10^6 cfu/g), and finally batch A (control batch) (2.9×10^6 cfu/g). Regarding the coliform population, batch C and batch D (1.0 and 6.0×10^2 cfu/, respectively) achieved lower counts than batch B (5.0×10^3 cfu/g) and batch A (1.5×10^4 cfu/g). Evolution of microbial loads after 14 days of storage ($t=14$) showed that batch C achieved the lowest mesophilic counts (4.3×10^6 cfu/g), followed by batch D (1.1×10^7 cfu/g), then batch B (2.1×10^7 cfu/g), and finally batch A (control batch) (4.3×10^7 cfu/g). Concerning coliform numbers, batch D bore the lowest population (4.5×10^2 cfu/g), then batches B and C (3.8×10^3 and 5.0×10^3 cfu/g), with batch A (control batch) having the highest population (2.5×10^4 cfu/g). No differences in counts of *St. aureus* and *Clostridium* spp. were observed in any batch, and *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. were not detected in the samples.

Megrim bacterial populations determined just after reception ($t=0$), were 1.9×10^6 cfu/g of mesophiles, 9.5×10^3 cfu/g of coliforms, <10 cfu/g of *St. aureus* and *Clostridium* spp., absence of *Salmonella* spp., and presence of *Listeria* spp. (Table V.5). After 7 days of storage ($t=7$) batch C presented the lowest numbers of mesophiles (5.6×10^6 cfu/g), followed by batches B, D and A (control batch) (1.5×10^7 , 2.2×10^7 , and 2.4×10^7 cfu/g, respectively). Concerning the coliform population, batches B and C presented lower counts (3.0×10^3 and 3.5×10^3 cfu/g, respectively) than batches D and

A (control batch). After 14 days of storage ($t=14$), batches B and D presented the lowest mesophile counts (7.3×10^7 cfu/g), followed by batches D and A (1.1×10^8 and 1.7×10^8 cfu/g, respectively), while batch B reached lower counts (6.0×10^3 cfu/g) than batches C (2.0×10^4 cfu/g), D (2.0×10^4 cfu/g), and A (control batch) (8.5×10^4 cfu/g) for coliform population. It should be noted that the presence of *Listeria* spp. was detected in batch A (control batch) after both 7 and 14 days of storage. No differences were observed in counts of *St. aureus* and *Clostridium* spp., and *Salmonella* spp. were not detected in the samples.

Table V.5. Microbiological analyses of young hake (*M. merluccius*) and megrim (*L. boscii*) during the semi-industrial biopreservation trials.

Time (days)	Batch	Mesophiles (cfu/g)	Coliforms (cfu/g)	<i>St. aureus</i> (cfu/g)	<i>Clostridium</i> spp. (cfu/g)	<i>Salmonella</i> spp. ^a	<i>Listeria</i> spp. ^a
Young hake (<i>M. merluccius</i>)							
0	A	2.1×10^4	1.0×10^1	< 10	< 10	-	-
7	A	2.9×10^6	1.5×10^4	< 10	< 10	-	-
	B	5.0×10^5	5.0×10^3	< 10	< 10	-	-
	C	1.3×10^6	1.0×10^2	< 10	< 10	-	-
	D	5.5×10^5	6.0×10^2	< 10	< 10	-	-
14	A	4.3×10^7	2.5×10^4	< 10	< 10	-	-
	B	2.1×10^7	3.8×10^3	< 10	< 10	-	-
	C	4.3×10^6	5.0×10^3	< 10	< 10	-	-
	D	1.1×10^7	4.5×10^2	< 10	< 10	-	-
Megrim (<i>L. boscii</i>)							
0	A	1.9×10^6	9.5×10^3	< 10	< 10	-	+
7	A	2.4×10^7	1.6×10^4	< 10	< 10	-	+
	B	1.5×10^7	3.0×10^3	< 10	< 10	-	-
	C	5.6×10^6	3.5×10^3	< 10	< 10	-	-
	D	2.2×10^7	1.4×10^4	< 10	< 10	-	-
14	A	1.7×10^8	8.5×10^4	< 10	< 10	-	+
	B	7.3×10^7	6.0×10^3	< 10	< 10	-	-
	C	1.1×10^8	2.0×10^4	< 10	< 10	-	-
	D	7.3×10^7	2.0×10^4	< 10	< 10	-	-

^aMicrobiological determinations were based on methods for evaluation of presence (+) or absence (-) in 25 g of fish sample. For batch description see Table V.2.

V.4.2.2. Sensory evaluation

In this part of the study at a semi-industrial scale, a sensorial evaluation was carried out at the Marín retail fish market by a professional fish appraiser (Table V.6). The results obtained for young hake revealed that, after 7 days of storage ($t=7$), batches B and A (control batch) were overall better than batches D and C. Batch B was better than batch A (control batch) for 4 out of the 7 descriptors evaluated (general appearance, skin [slim], eye, and meat texture), while batch A (control batch) was

better than batch B in the other 3 descriptors (gills color, peritoneum adherence, and meat color). However, after 14 days of storage (t=14), batch D was the best for all the descriptors, except for eye descriptor which was equally rated for all batches. It should be noted that batch A (control batch) performed worse than the other batches in all the descriptors except for meat color, which was worst in batch C.

For megrim, after 7 days of storage (t=7), the fish appraiser chose batch A (control batch) as the best for all the descriptors except for skin, which was better in batch C (Table V.6). On the other hand, batch D was the worst in all descriptors except for meat color, which was worse in batch C. After 14 days of storage (t=14), batch B was the best for all the descriptors except for peritoneum adherence, which was better in batch D, and batch A (control batch) was the worst for all descriptors.

Table V.6. Sensorial analysis of young hake (*M. merluccius*) and megrim (*L. boscii*) performed by a professional fish appraiser^a.

Time (days)	General appearance	Skin (slime)	Gills color	Eye	Peritoneum	Meat texture	Meat color
Young hake (<i>M. merluccius</i>)							
7	B > A > D > C	B > A > D > C	A > D > B > C	B > A > D > C	A > B > C > D	B > A > C > D	A > B > D > C
14	D > C > B > A	D > C > B > A	D > C > B > A	D = B = C = A	D > B > C > A	D > B > C > A	D > B > A > C
Megrim (<i>L. boscii</i>)							
7	A > C > B > D	C > A > B > D	A > C > B > D	A > C > B > D	A > B > C > D	A > C > B > D	A > B > D > C
14	B > D > C > A	B > C > D > A	B > D > C > A	B > D > C > A	D > B > C > A	B = C = D = A	B > C > D > A

^aBatches were enumerated from best batch > worse batch. For batch description see Table V.2.

Finally, the effect of the protective culture or the food ingredient on the sensory characteristics of fish was evaluated by an expert fish appraiser who concluded that all the biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than the respective control batches.

V.5. DISCUSSION

Galicia is the Spanish region with the highest number of fishing vessels (nearly 5000 according to the 2010 census) and tones of annual landed fish (Xunta de Galicia, 2008). This makes it one of the main fishing regions at European and worldwide scale, not only due to the importance of the landings at an international scale, but also to the variety of fishing vessels and gears that are used in the Galician fisheries (Vázquez-Rowe *et al.*, 2011b). Consequently, Galicia may be a strategic area to implement appropriate measures leading to increased fish safety and quality. Immediately after fish capture, several chemical and biological changes take place, and thus fish is classified as a highly perishable food commodity. Fish shelf-life mainly depends on its initial microbiological quality and storage conditions, but the fishing method and subsequent handling practices thereafter also have a great influence (Gram and Huss, 1996; Fraser and Sumar, 1998b). Post-harvest handling, processing and transportation of fish require particular care in order to ensure proper quality and safety. In this context, *Lepidorhombus* spp. (*L. boscii* and *L. whiffiagonis*) and *M. merluccius* are the most important demersal fish species for the Galician fishing fleet. They are caught by various types of bottom-trawling gear in

multispecific fisheries (Sánchez *et al.*, 1998) in the Northern Stock (ICES Divisions VIIIa, b, d, and VII) and Southern Stock (ICES Divisions VIIIc and IXa), and have a particularly important commercial value (Vázquez-Rowe *et al.*, 2011a, 2011b). Therefore, the research and development of post-harvest preservation techniques to control the microbial loads of fish are essential to: (i) increase its shelf-life; (ii) reduce physical, organoleptic and nutritional losses, and (iii) preserve the quality and safety of the finished products (Gram and Huss, 1996).

Nowadays, food safety and quality is a major concern for the food industry, and fish and fishery products are in the forefront of its improvement because they are amongst the most internationally traded food commodities (FAO, 2004). However, with increasing consumer demands for fresh products with extended shelf-life and increasing energy costs associated with freezing and frozen storage, the fish-processing industry is actively seeking alternative methods of shelf-life preservation and marketability of fresh, refrigerated fish, and at the same time economizing on energy costs (Ashie *et al.*, 1996). Consequently, there is an increasing demand for more fresh and even raw food with enhanced natural flavours and produced with less or no use of chemical preservatives (FAO, 2004). Technologies applied to food processing must assure the quality and safety of the final product, thus every stage from initial production to processing, storage and consumption must be included in a food quality and safety programme. There already exist many control measures within the food industry to prevent or minimise bacterial contamination, including good manufacturing practices, effective sanitation and hygiene measures with respect to raw materials, the food plant, the food products, the food processing personnel and other basic fundamentals of an effective Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programme (Deegan *et al.*, 2006; FAO, 2005-2011b). However, despite these precautions and safety measures, the reported numbers of food-borne illnesses and intoxications are still on the increase (O'Sullivan *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006). In this context, biopreservation emerges as one of the most promising current food preservation techniques, which is gaining increasing attention as a means of naturally controlling the safety and shelf-life of food (O'Sullivan *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). In this respect, LAB may be considered as biopreservative agents as they can protect food from microbial spoilage and pathogenic microorganisms by competitive growth, and synthesis of antagonistic compounds such as organic acids and bacteriocins (Stiles, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Ross *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005; Tiwari *et al.*, 2009). However, the use of these microorganisms and/or their metabolites as biopreservatives must be combined with other preservation techniques such as refrigeration, vacuum-packing or modified atmosphere packaging (MAP), as a part of a hurdle technology (Leistner, 2000; Gálvez *et al.*, 2007; El Bassi *et al.*, 2009). For these reasons, during the last years, extensive research has been devoted to investigate the potential application of LAB and/or their antimicrobial compounds in food preservation of a variety of foods including fermented vegetables, meat and meat products, and dairy and fish products (Daeschel and Fleming, 1984; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1999, 2002; Cleveland *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003; Ringø *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009). In this context, the aim of this work was to evaluate a biopreservation strategy for fresh landed fish by the use

of bacteriocinogenic LAB of marine origin and/or their bacteriocin-containing supernatants. It should be mentioned that the development of biopreservation strategies for fish and fish products requires the identification of suitable LAB strains, preferably belonging to the microbiota present in fresh fish and processing environments, since they would already be acclimatized to a seafood habitat and therefore more competitive than LAB from other sources (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009). In a previous work (Chapter III), we isolated 197 LAB strains with antimicrobial activity from fish, seafood and fish products, from which 64 isolates were selected for further characterization. From these strains, 25 LAB isolates (20 *Enterococcus faecium*, 4 *Lactobacillus* spp., and 1 *Pediococcus pentosaceus*) were shown to be bacteriocin producers. The multi-bacteriocin producer strains *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58, isolated from dry-salted cod and albacore, respectively, were selected for their capability to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and other fish-spoilage microorganisms such as *Br. thermosphacta*, *Ps. fluorescens* and *Sh. putrefaciens*.

In the storage of fresh foods, such as raw fish, the most commonly found bacterial pathogens are *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Cl. perfringens*, *St. aureus* and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. (Garver and Muriana, 1993; Huss *et al.*, 2000), as well as *Brochothrix* spp., *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp. (Huss *et al.*, 2000; González-Rodríguez *et al.*, 2002; Gram and Dalgaard, 2002; Herrera *et al.*, 2006). It has been also established that some human pathogens such as *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., and *E. coli* can be spread by aquatic birds mainly in aquaculture environments, but normal cooking procedures eliminate the risk of these pathogens, so the safety concerns are therefore primarily related to consumption of raw fish (Huss *et al.*, 2000). In chilled seafood, Gram-positive pathogens are normally of lesser concern than the Gram-negative spoilage bacteria present, such as *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp. and *Enterobacteriaceae*, which grow more rapidly (Jeppesen and Huss, 1993; Huss *et al.*, 2000). Besides, lightly preserved fish products, such as smoked fish, also belong to a high-risk category with respect to the food-borne pathogen *L. monocytogenes* (FAO/WHO, 2004). In this context, it has been reported that listeriosis has typically been caused by ready-to-eat (RTE) processed foods that have a long refrigerated shelf-life (Loncarevic *et al.*, 1996; Rocourt *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2000). In the last years, several studies have reported the utilisation of bacteriocinogenic- and non-bacteriocinogenic-LAB strains to improve the quality and shelf-life of fish products (Jeppesen and Huss, 1993; Einarsson and Lauzon, 1995; Duffes *et al.*, 1999a; Nilsson *et al.*, 1999; Katla *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2004; Brillet *et al.*, 2005; Ghalfi *et al.*, 2006; Tomé *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Tahiri *et al.*, 2009). In this work, the potential of two bacteriocinogenic LAB strains, *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58, for fresh landed fish biopreservation was first tested at a laboratory scale. The application strategies of the culture and/or the bacteriocin-containing supernatant were evaluated by inoculating different batches of fresh landed fish with the culture(s) as protective culture(s), and/or the bacteriocin-containing supernatant(s) as food ingredient(s) or lyophilized food ingredient(s), and a different pattern of reduction in microbial loads of fresh fish was obtained depending on the biopreservation strategy applied to the samples. Regarding young hake, microbiological analyses at the end of the trial revealed that when fresh fish was inoculated with *E. faecium* BNM58 protective culture (batch C) or a mixture of *E. faecium* BNM58 and

Lb. curvatus BCS35 protective cultures (batch D), mesophilic and coliforms populations were lower than in the other batches, including control batch (batch A). On the other hand, batches treated with a lyophilized food ingredients of bacteriocins from *E. faecium* BNM58 (batch G) or a mixture of lyophilized food ingredient from *E. faecium* BNM58 and *Lb. curvatus* BCS35 (batch H) yielded the lowest *St. aureus* populations. The batch where the bacteriocins were applied by spraying a mixture of the food ingredients (batch E) only presented slightly better results than control batch (batch A) at 7 days of storage, but were worse after 14 days of storage, and thus this application method was discarded in the following trials. In addition, sensorial analyses at end of the trial showed that batches inoculated with *Lb. curvatus* BCS35 protective culture (batch B) or with a mixture of the former with *E. faecium* BNM58 protective culture (batch D) were preferred by the panellists for most of the descriptors such as general appearance, skin (slime), gills color and odor, eye morphology, and meat texture. Concerning results of megrim biopreservation, microbial analyses at the end of the trial revealed that those batches inoculated with the protective cultures from *Lb. curvatus* BCS35 (batch B), *E. faecium* BNM58 (batch C) or their combination (batch D), and also batches treated with the food ingredient from *Lb. curvatus* BCS35 (batch E) or *E. faecium* BNM58 (batch F), yielded the best results for coliforms populations. Batches treated with any of the lyophilized food ingredients (batches H, I and J) were worse than all other batches, including control batch (batch A). However, no significantly differences were observed amongst any of the treated batches and control batch (batch A) for mesophilic populations. The results of sensorial analyses at the end of the trials revealed that those batches inoculated with *Lb. curvatus* BCS35 (batch B) or *E. faecium* BNM58 protective cultures (batch C) or their combinations (batch D) were preferred by the panellists for all the descriptors except eye morphology and meat texture. It should be noted that *L. monocytogenes* was detected in the control batch (batch A) after 7 and 14 days of megrim storage and 14 days of young hake storage, but this pathogen was not detected in any of the biopreserved batches. The control of *Listeria* spp. growth by inoculating bacteriocinogenic LAB strains or adding semi-purified bacteriocins in cold-smoked salmon has been thoroughly studied (Duffes *et al.*, 1999a, 1999b; Katla *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Tomé *et al.*, 2008, Tahiri *et al.*, 2009). On the other hand, production and persistence of bacteriocin activity in foods is very difficult to measure probably due to interactions with the food matrix or possible transfer of activity from the salmon flesh to the packaging during storage (Duffes *et al.*, 1999a; Vaz-Velho *et al.*, 2005). In this respect, Richard *et al.* (2003) demonstrated that the inhibitory effect of *C. divergens* V41 against *L. monocytogenes* in a salmon model medium was due to its ability to produce divercin V41, since a bacteriocin deficient mutant of *C. maltaromaticum* (formerly *C. divergens*) V41 failed to suppress growth of *L. monocytogenes*. In addition to this result, Nilsson *et al.* (2004) carried out a study to assess the contribution of bacteriocins to the inhibition of *L. monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. In their study, a *Carnobacterium* strain with bacteriocin activity and a non-bacteriocinogenic mutant were examined against *L. monocytogenes*, which revealed that bacteriocins are not indispensable for pathogen reduction since the non-bacteriocinogenic mutant had a marked antilisterial effect. Our results show that regardless of the application method, *L. monocytogenes* was inhibited in the fish samples, showing

the potential of these bacteriocinogenic LAB protective cultures and their bacteriocin-containing food ingredients to eliminate this food-borne pathogenic bacterium from fresh fish stored at 0–2°C for 14 days.

Enterococcus spp. are natural members of the digestive microbiota of both humans and animals, and they are also commonly isolated from foods, plants, water and soil. In addition, some enterococcal strains are used as starter cultures in cheese processing (Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Ogier and Serror, 2008). Enterococci have been isolated from different aquatic habitats such as bathing waters (Arvanitidou *et al.*, 2001), waste water (Valdivia *et al.*, 1996), coastal marine environments (Audicana *et al.*, 1995; Quigg *et al.*, 2009), groundwater (Rice *et al.*, 1995; Manero and Blanch, 1999), and aquaculture waters (Cai *et al.*, 1999; Ringø *et al.*, 2005). They may survive long periods in a marine environment due to their capacity to tolerate high salt concentrations and their wide range of growth temperatures (Harwood *et al.*, 2000; Giraffa, 2002; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ogier and Serror, 2008; Valenzuela *et al.*, 2010). Bacteriocin-producing enterococci have been isolated from a wide range of foods, including fresh fish products like shellfish (Wilson and McAfee, 2002; Pinto *et al.*, 2009), intestine of fish from integrated fish farming (Petersen and Dalsgaard, 2003), intestine of common carp and freshwater prawns (Cai *et al.*, 1999), skin, gills and gut of brown trout, wild pike and aquacultured rainbow trout (González *et al.*, 1999), freshwater fishes and their surrounding habitats (González *et al.*, 2000), muscle of farmed turbot (Campos *et al.*, 2006), subtropical marine fish (Al Bulushi *et al.*, 2010), and also from processed fish products like cold-smoked salmon (Tomé *et al.*, 2008), traditionally processed fish of the Himalayas (Thapa *et al.*, 2006) and commercial raw seafood products (Valenzuela *et al.*, 2010). Moreover, in a previous work (Chapter III), it was found that *Enterococcus* spp. isolates (*E. faecium* and *E. faecalis*) were present in all tested fish samples except marinated Atlantic salmon, representing a 73.4% of the selected isolates showing direct antimicrobial activity. The potential of bacteriocinogenic *E. faecium* strains against *L. monocytogenes* and other food-borne pathogenic bacteria is well documented (Giraffa, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998; Foulquié Moreno *et al.*, 2003, 2006; Valenzuela *et al.*, 2010), and several *E. faecium* strains have already been proposed as starter culture or co-cultures in dairy and fermented foods (Casaus *et al.*, 1997; Leroy *et al.*, 2003; Achemchem *et al.*, 2005; Ogier and Serror, 2008). Nevertheless, in the last decade, enterococci have become important nosocomial pathogens and have been associated with a number of human infections such as urinary tract infections, endocarditis and bacteremia (Morrison *et al.*, 1997; Hunt, 1998). The overgrowing concerns about the genus *Enterococcus* are emphasized by the fact that particular strains exhibit acquired and transferable antibiotic resistances, and display multiple antibiotic resistances. For this reason, *Enterococcus* spp. is the most controversial genus of LAB and, contrary to other genera of this heterogeneous bacterial group, it has been excluded for the QPS (Qualified Presumption of Safety) status by the European Food Safety Agency (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007). *E. faecium* BNM58 lacks the typical enterococcal virulence genes, is sensitive to antibiotics of clinical relevance, and does not exert hemolysin, gelatinase and protease activities (Chapter III); however, it was excluded from the second part of our study because the application of

enterococcal strains in foods is very controversial due to the difficulty of achieving the EFSA approval for its use as food-biopreservatives.

In the second part of the study, the biopreservation of fresh fish was evaluated at a semi-industrial scale by using the multi- bacteriocin producer QPS strain *Lb. curvatus* BCS35. These trials were performed at the Marín retail fish market to know the opinion of the professional fish appraiser. The microbiological results for young hake and megrim at the end of the trials showed that all treated batches (batches B, C and D) yielded lower bacterial counts than the control batch (batch A). For young hake, the highest reduction of mesophilic counts was obtained for fish inoculated with *Lb. curvatus* BCS35 protective culture reinforced with a lyophilized food ingredient (batch C), while the highest reduction of coliforms was obtained for fish treated with the food ingredient from *Lb. curvatus* BCS35 (batch D). On the other hand, for megrim, fish inoculated with *Lb. curvatus* BCS35 protective culture (batch B) yielded a higher reduction in both mesophilic and coliform numbers. It should be noted that *Listeria* spp. was detected in megrim and young hake, but interestingly, only in the control batch (batch A), which confirms the effectiveness of some LAB strains and its bacteriocins to control *L. monocytogenes* in foods (Duffes *et al.*, 1999a, 1999b; Katla *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Tomé *et al.*, 2008, Tahiri *et al.*, 2009). The results given by the fish appraiser brought into evidence the potential of the tested strategies for fresh fish biopreservation, since in both young hake and megrim the control batch (batch A) performed worse than all other batches (batches B, C and D) at the final stage of the trials. It should be noted that the length of the trials was designed according to the time the fish is stored during the fishing trip before it is sold at the market. Young hake treated with the cell-free culture supernatant from *Lb. curvatus* BCS35 as food ingredient (batch D) and megrim inoculated with *Lb. curvatus* BCS35 protective culture (batch B) were chosen as the best for almost all the descriptors, and according to the fish appraiser they would reach a higher price in the market.

In summary, the present work demonstrates for the first time the potential of bacteriocinogenic LAB strains and its bacteriocins as biopreservatives for fresh fish during refrigerated storage. The multi-bacteriocin producer strain of marine origin *Lb. curvatus* BCS35, applied either as protective culture or food ingredient, can be considered a suitable and effective fish-biopreservative; nevertheless, further studies are required to optimize bacteriocin production and up-scale the process in order to offer the fish industry an effective strategy and economically profitable to be used as part of a hurdle-based preservation technology.

V.6. REFERENCES

- Achemchem, F., M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia, and M. Maqueda. 2005. Enterococcus faecium F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99: 141–150.
- Al Bulushi, I. M., S. E. Poole, R. Barlow, H. C. Deeth, and G. A. Dykes. 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int. J. Food. Microbiol.* 138: 32–38.

- Anonymous.** 1991. Microbiological of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique (ISO 4832:1991). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous.** 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous.** 1999. Microbiology of food and feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO 6888-1:1999). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous.** 2003a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees Celsius (ISO 4833:2003). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous.** 2003b. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579:2003). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Arvanitidou, M., V. Katsouyannopoulos, and A. Tsakris.** 2001. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J. Med. Microbiol.* 50: 1001–1005.
- Ashie, I. N., J. P. Smith, and B. K. Simpson.** 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 87–121.
- Audicana, A., I. Perales, and J. J. Borrego.** 1995. Modification of kanamycin-esculin-azide agar to improve selectivity in the enumeration of fecal streptococci from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4178–4183.
- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga, and I. F. Nes.** 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676–1682.
- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal, and F. Leroi.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 309–324.
- Cai, Y., P. Suyanandana, P. Saman, and Y. Benno.** 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Gen Appl. Microbiol.* 45: 177–184.
- Cakli, S., B. Kilinc, T. Dincer, and S. Tolasa.** 2006. Effects of using slurry ice during transportation on the microbiological, chemical, and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 453–458.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal, and J. Barros-Velazquez.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1: 43–63.
- Campos, C. A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado, and J. Barros-Velázquez.** 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356–364.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Chen, H. and D. G. Hoover.** 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 82–100.

- Chen, C.-M., J. G. Sebranek, J. S. Dickson, and A. F. Mendonca. 2004. Combining pediocin with post-packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *J. Food Prot.* 67: 1866–1875.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaús, M. F. Fernández, and P. E. Hernández. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaús, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281–305.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Daeschel, M. A. and H. P. Fleming. 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1: 303–313.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Diep, D. B. and I. F. Nes. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchar, L. M. McMullen, and H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Duffes, F., C. Corre, F. Leroi, X. Dousset, and P. Boyaval. 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62: 1394–1403.
- Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval, and X. Dousset. 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 33–42.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato, and T. Matsui. 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA. 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed. *EFSA Scientific Colloquium*, Summary Report, October 2005.
- EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.

- Einarsson, H. and H. L. Lauzon.** 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669–676.
- FAO (Food and Agriculture Organization).** 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 444.
- FAO.** 2005-2011a. World inventory of fisheries. Reducing post-harvest losses. Issues Fact Sheets. Text by Lahsen Ababouch. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 27 May 2005. [Cited 28 November 2011]. <http://www.fao.org/fishery/topic/12369/en>.
- FAO.** 2005-2011b. Fisheries and Aquaculture topics. Safety of fish and fish products. Topics Fact Sheets. Text by Lahsen Ababouch. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 27 May 2005. [Cited 25 May 2011]. <http://www.fao.org/fishery/topic/1514/en#container>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization).** 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. FAO and WHO, Rome, Italy.
- Fernández-Macho, J., C. Gallastegui, and P. González.** 2004. Economic impacts of the Galician fishing sector: a supply-driven SAM approach. *JEL classification*: Q22, R15, C67, D57.
- Foulquié Moreno, M. R., M. C. Rea, T. M. Cogan, and L. de Vuyst.** 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73–84.
- Foulquié Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. de Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Fraser, O. P. and S. Sumar.** 1998a. Compositional changes and spoilage in fish—an introduction. *Nutr. Food Sci.* 98: 275–279.
- Fraser, O. P. and S. Sumar.** 1998b. Compositional changes and spoilage in fish (part II)—microbiological induced deterioration. *Nutr. Food Sci.* 98: 325–329.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Garriga, M., M. T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort, and M. Hugas.** 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509–518.
- Garver, K. I. and P. M. Muriana.** 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 241–258.
- Ghalfi, H., A. Allaoui, J. Destain, N. Benkerroum, and P. Thonart.** 2006. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J. Food Prot.* 69: 1066–1071.
- Giraffa, G.** 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 291–299.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215–222.
- González, C. J., T. M. López-Díaz, M. L. García-López, M. Prieto, and A. Otero.** 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62: 1270–1277.
- González, C. J., J. P. Encinas, M. L. García-López, and A. Otero.** 2000. Characterisation and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiol.* 17: 383–391.

- Gonzalez-Rodríguez, M. N., J. J. Sanz, J. A. Santos, A. Otero, and M. L. García-López.** 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 161–168.
- Graham J., W. A. Johnston, and F. J. Nicholson.** 1992. Ice in fisheries. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 331.
- Gram, L. and H. H. Huss.** 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–137.
- Gram, L. and P. Dalgaard.** 2002. Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 262–266.
- Harwood, V. J., J. Whitlock, and V. Withington.** 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3698–3704.
- Herbert, R. A. and J. M. Shewan.** 1975. Precursors of the volatile sulphides in spoiling North Sea Cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 26: 1195–1202.
- Herbert, R. A. and J. M. Shewan.** 1976. Roles played by bacterial and autolytic enzyme in the production of volatile sulfides in spoiling North Sea Cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 27: 89–94.
- Herrera, F. C., J. A. Santos, A. Otero, and M. L. García-López.** 2006. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 100: 527–536.
- Hobbs, G.** 1982. Changes in fish after catching. In: “*Fish handling and processing*”, pp. 20–27, 2nd edition. Aitken A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt, and M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, UK.
- Hugas, M., M. Garriga, and M. T. Aymerich.** 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 223–233.
- Hunt, C. P.** 1998. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br. J. Biomed. Sci.* 55:149–156.
- Huss, H. H.** 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 348.
- Huss, H. H., A. Reilly, and P. K. Ben Embarek.** 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11: 149–156.
- Jeppesen, V. F. and H. H. Huss.** 1993. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 179–186.
- Katla, T., T. Møretrø, I. M. Aasen, A. Holck, L. Axelsson, and K. Naterstad.** 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18: 431–439.
- Kelman, J. H.** 1982. Handling wet fish at sea. In: “*Fish handling and processing*”, pp. 28–41, 2nd edition. Aitken A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt, and M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, UK.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Leroi, F.** 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27: 698–709.
- Leroy, F., M. R. Foulquie Moreno, and L. de Vuyst.** 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 235–240.
- Loncarevic, S., W. Tham, and M. L. Danielsson-Tham.** 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in smoked and 'gravad' fish. *Acta Vet. Scand.* 37: 13–18.

- Manero, A. and A. R. Blanch.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425–4430.
- Modi, K. D., M. L. Chikindas, and T. J. Montville.** 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 249–253.
- Morrison, D., N. Woodford, and B. Cookon.** 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol.* 83: 89S–99S.
- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faid, and A. Bouseta.** 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 295–310.
- Nilsson, L., L. Gram, and H. H. Huss.** 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62: 336–342.
- Nilsson, L., Y. Y. Ng, J. N. Christiansen, B. L. Jorgensen, D. Grotinum, and L. Gram.** 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96: 133–143.
- Núñez, M., J. L. Rodríguez, E. García, P. Gaya, and M. Medina.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671–677.
- Ogier, J. C. and P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291–301.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Petersen, A. and A. Dalsgaard.** 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ. Microbiol.* 5: 395–402.
- Pinto, A. L., M. Fernandes, C. Pinto, H. Albano, F. Castilho, P. Teixeira, and P. A. Gibbs.** 2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 50–58.
- Quigg, A., L. Broach, W. Denton, and R. Miranda.** 2009. Water quality in the Dickinson Bayou watershed (Texas, Gulf of Mexico) and health issues. *Mar. Pollut. Bull.* 58: 896–904.
- Rice, E. W., J. W. Messer, C. H. Johnson, and D. J. Reasoner.** 1995. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 374–376.
- Richard, C., A. Brillet, M. F. Pilet, H. Prevost, and D. Drider.** 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 288–292.
- Ringø, E., U. Schillinger, and W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: “*Microbial Ecology in Growing Animals*”, pp. 418–453. Holzapfel, W. H., P. J. Naughton, S. G. Pierzynowski, R. Zabielski, and E. Salek (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, UK.
- Rocourt, J., C. Jacquet, and A. Reilly.** 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 197–209.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney, and C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337–346.
- Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Ross, R. P., P. Sporns, H. M. Dodd, M. J. Gasson, F. A. Mellon, and L. M. McMullen.** 2003. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3174–3178.

- Sánchez, F., N. Pérez, and J. Landa.** 1998. Distribution and abundance of megrim (*Lepidorhombus boscii* and *Lepidorhombus whiffiagonis*) on the northern Spanish shelf. *ICES J. Mar. Sci.* 55: 494–514.
- Shawyer, M. and A. F. Medina Pizzali.** 2005. The use of ice on small fishing vessels. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 436.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Bénéch, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet, and I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.
- Tahiri, I., M. Desbiens, E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss.** 2009. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiol.* 26: 783–793.
- Tham, W., H. Ericsson, S. Loncarevic, H. Unnerstad, and M. L. Danielsson-Tham.** 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 173–175.
- Thapa, N., J. Pal, and J. P. Tamang.** 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 33–38.
- Tiwari, B. K., V. P. Valdramidis, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, and P. J. Cullen.** 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5987–6000.
- Tomé, E., P. A. Gibbs, and P. C. Teixeira.** 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 285–294.
- Uhart, M., S. Ravishankar, and N. D. Maks.** 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4°C. *J. Food Prot.* 67: 2296–2301.
- Valdivia, E., I. Martín-Sánchez, R. Quirantes, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez, and M. Maqueda.** 1996. Incidence of antibiotic resistance and sex pheromone response among enterococci isolated from clinical human samples and from municipal waste water. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 538–544.
- Valenzuela, A. S., N. Benomar, H. Abriouel, M. M. Cañamero, and A. Gálvez.** 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* 27: 955–961.
- Vaz-Velho, M., S. Todorov, J. Ribeiro, and P. Gibbs.** 2005. Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control* 16: 541–549.
- Vázquez-Rowe, I., M. T. Moreira, and G. Feijoo.** 2011a. Life cycle assessment of fresh hake fillets captured by the Galician fleet in the Northern Stock. *Fish. Res.* 110: 128–135.
- Vázquez-Rowe, I., M. T. Moreira, and G. Feijoo.** 2011b. Estimating global discards and their potential reduction for the Galician fishing fleet (NW Spain). *Mar. Policy.* 35: 140–147.
- Wilson, I. G. and G. G. McAfee.** 2002. Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 143–151.
- Xunta de Galicia.** 2008. Anuario de Pesca [in Galician]. Regional Ministry of Fisheries and Sea Affairs, Galicia, Spain.
- Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue, and T. J. Montville.** 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66: 1420–1425.

CAPÍTULO VI

Producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15:
detección y cuantificación de su producción
por *Lactobacillus curvatus* BCS35 y cepas recombinantes
de *Lactococcus lactis* mediante técnicas microbiológicas
e inmunoquímicas

CHAPTER VI

*Heterologous production of curvacins G14 and G15:
detection and quantification of their production
by Lactobacillus curvatus BCS35 and recombinant
Lactococcus lactis strains by microbiological and
immunochemical techniques*

VI.1. ABSTRACT

The bacteriocins curvacin G14 (CurG14) (a sakacin P [SakP] variant containing a Tyr instead of His at position 12) and curvacin G15 (CurG15) (sakacin X [SakX]) are partially responsible for the antimicrobial activity exerted by the multiple bacteriocin producer strain *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35 against spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* (Chapter IV). The broad antimicrobial spectrum of these bacteriocins and the *in vivo* demonstration of their good performance in the biopreservation of fresh landed fish (Chapter V) prompted interest in the development of heterologous hosts which could improve their antimicrobial activity and/or production. In this respect, we report herein the heterologous production of CurG14 and CurG15 by *Lactococcus lactis*, as well as their microbiological and immunochemical detection and quantification in the wild-type and the recombinant producer strains. For this purpose, chimeric genes encoding fusions of the signal peptide of the Usp45 (SP_{Usp45}) protein to the mature CurG14 and CurG15 bacteriocins were cloned into the pNZ8048 vector under control of the nisin-inducible promoter (P_{nisA}), generating the plasmids pNUG14E and pNUG15E, respectively. These plasmids were transformed into *Lc. lactis* NZ9000, resulting in several recombinant strains from which *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) were selected for further characterization. Mass spectrometry analyses of CurG14 and CurG15 purified from the supernatants of the selected recombinant strains showed that both peptides were correctly processed and secreted. Antimicrobial activity and bacteriocin production of the recombinant strains were detected and quantified in cell-free culture supernatants from cultures induced with nisin A (NisA) at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.3, 0.5 and 0.9, and further grown for 1.5, 3 and 5 h, and compared with those present in the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 cultures grown at 4, 8, 18, 25, 30 and 37°C. The maximum antimicrobial activity of the selected recombinant strains *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) (2,430 and 22,843 BU/ml, respectively) was found at an OD₆₀₀ of 0.5, and 3 h after induction. Likewise, quantification of the recombinant bacteriocins by using a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) and the specific anti-CurG14 and anti-CurG15 polyclonal antibodies generated in this work showed that these conditions also resulted in the maximum production of both bacteriocins (4,896 and 17,149 ng/ml of CurG14 and CurG15, respectively). Interestingly, these concentrations represent a 20- and a 4-fold increase in the production of CurG14 and CurG15, respectively, with respect to the maximum production quantified in the wild-type producer *Lb. curvatus* BCS35, demonstrating the usefulness of the genetic procedure and the recombinant strains generated in this work for the heterologous production of these bacteriocins showing a broad antimicrobial spectrum against food-spoilage and pathogenic bacteria of relevance for the food industry.

VI.2. INTRODUCTION

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) constitute a large and heterogeneous group of ribosomally synthesized peptides or proteins displaying antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive and, to a lesser extent, Gram-negative bacteria (Jack *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Messaoudi *et al.*, 2012; de la Fuente-Salcido *et al.*, 2012). LAB bacteriocins may be classified into three main classes: (i) the lantibiotics, or post-translationally modified peptides; (ii) the non-modified, small, heat-stable peptides, and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins (Nes *et al.*, 1996; Nes and Holo, 2000; Eijsink *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006). Class II bacteriocins may be further grouped into five subclasses: (i) the subclass IIa, comprising the pediocin-like bacteriocins characterized by a conserved N-terminal motif (YGNGVxC); (ii) the subclass IIb, made up of the bacteriocins whose full activity is dependent on the presence of two different peptides; (iii) the subclass IIc, containing the leaderless bacteriocins; (iv) the subclass IId, including the circular bacteriocins, and (v) the subclass IIe, consisting of other peptide-bacteriocins (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). Production of most class II bacteriocins relies on a well-conserved genetic organization including four clustered genes usually organized in one or two operons: (i) the structural gene encoding the preprobacteriocin; (ii) the gene encoding its dedicated immunity protein, which confers producer self-protection against the toxicity of the bacteriocin; (iii) a gene encoding a dedicated ATP-binding cassette (ABC) transporter required for processing and transport of the bacteriocin, and (iv) a gene encoding an accessory protein required for proper bacteriocin externalization (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). In this context, most lantibiotics and class II bacteriocins, such as curvacin G14 (CurG14) (a sakacin P [SakP] variant containing a Tyr instead of His at position 12) and curvacin G15 (sakacin X [SakX]) produced by *Lb. curvatus* BCS35 (Chapter IV), are synthesized as biologically inactive precursors containing an N-terminal extension of the so-called double-glycine-type (leader sequence) which is cleaved off concomitantly with secretion of the active bacteriocin (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006). However, some class II bacteriocins such as enterocin P (EntP) contain an N-terminal extension of the so-called Sec type (signal peptide), which is proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GPS) or Sec-dependent pathway (Cintas *et al.*, 1997; Diep and Nes, 2002; Herranz and Driessen, 2005). The Sec system is a universally conserved protein export system that translocates unfolded proteins across the cell membrane via a protein-conducting pore formed by the SecYEG complex and a molecular motor, the ATPase SecA. Proteins secreted by this system are equipped with an N-terminal signal peptide (SP) that functions as target and recognition signal for signal peptidases that remove the SP from the translocated protein, resulting in the extracellular release of the mature protein or peptide (Driessen and Nowen, 2008; Natale *et al.*, 2008). On the other hand, only a few bacteriocins described to date are synthesized without an N-terminal extension, including enterocin L50A (L50A and L50B) (EntL50 [EntL50A and EntL50B]) (Cintas *et al.*, 1998a), enterocin Q (EntQ) (Cintas *et al.*, 2000), and bacteriocin LsbB (Gajic *et al.*, 2003), and it has been demonstrated that secretion of the leader-less bacteriocins EntQ from *Enterococcus faecium* L50 and bacteriocin

LsbB from *Lactococcus lactis* BMG-1 is mediated by ABC-type multidrug resistance (MDR) transporters (Gajic *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2006a). Finally, for those bacteriocins whose production is transcriptionally regulated by a three-component signal-transduction system, additional genes encoding a dedicated pheromone peptide (the induction factor), a histidine protein kinase (the sensor protein), and a response regulator (the effector protein) are also required (Nes *et al.*, 1996; Nes and Eijssink, 1999; Ennahar *et al.*, 2000; Skaugen *et al.*, 2003).

In recent years, biopreservation technology, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety using microorganisms and/or their metabolites (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002), has gained much attention. The long history of safe human exposure to LAB has resulted in granting of the QPS status to the majority of the microorganisms included in this group (EFSA 2005a, 2005b; EFSA 2007; EFSA, 2011), and, consequently, in their possible application in food biopreservation. In this respect, there are four main general strategies to use LAB and/or their bacteriocins as food biopreservatives: (i) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* as a protective and/or starter culture; (ii) use of a substrate previously fermented by a bacteriocin-producing strain as a food ingredient; (iii) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, and/or (iv) incorporation or immobilization of the bacteriocin in or onto packaging materials for development of bioactive food packaging (Cleveland *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2008). The potential application of bacteriocins in food preservation would be greatly facilitated by the development of efficient procedures for their detection and quantification in different substrates. In this respect, specific antibodies have been successfully used for bacteriocin identification and detection by immunochemical assays, such as immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Martínez *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002; Keren *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b; Sánchez *et al.* 2008; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b).

Despite of the great interest attracted by the potential use of bacteriocins as natural food preservatives, in human and veterinary therapeutic formulations, and in animal production (Cintas *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2008; Lohans and Vederas, 2012), the low yields obtained when they are purified from their natural bacterial producers and the high cost of synthetic bacteriocin production makes it necessary to explore alternative production systems such as those based on heterologous microbial hosts (Martínez *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Sánchez *et al.*, 2007, 2008; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b; Lohans and Vederas, 2012). In this respect, the QPS bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, mainly in conjunction with the Nisin Inducible Controlled Expression (NICE) system (van de Guchte *et al.*, 1992; Kuipers *et al.*, 1995; de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998; Mierau and Kleerebezem, 2005), has been extensively used over the last decades as a valuable bacterial expression system for large-scale production of homologous or heterologous proteins (Kleerebezem *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1997; Kunji *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2004; Rigoulay *et al.*, 2004). Amongst the features that facilitate the use of this host for heterologous protein production are: (i) a relatively simple and well characterized metabolism; (ii) the existence of several lactococcal genomes either completely sequenced or close to completion (Bolotin *et al.*, 2001, 2002; Wegmann *et al.*, 2007), and (iii) the secretion of only one major protein, Usp45, to the medium (van

Asseldonk *et al.*, 1993), which simplifies downstream purification process and allows an easier large scale-up production process (Mierau *et al.*, 2005a, 2005b). The development of *Lc. lactis* compatible genetic engineering tools and expression plasmids simplified the use of this food-grade host organism for recombinant protein production (Platteeuw *et al.*, 1996; Bron *et al.*, 2002). In this respect, the NICE system, derived from the *nis* operon (*nis*ABTCIPRKFE_G) involved in the biosynthesis of the antimicrobial peptide nisin A (NisA) produced by some *Lc. lactis* strains, is one of the most widely used gene expression systems in Gram-positive bacteria (Mierau and Kleerebezem, 2005; Morello *et al.*, 2008). This system contains the regulatory elements of the *nisA* operon (*i.e.*, the nisin-inducible promoter P_{nisA}) and the two-component signal transduction system *nisRK*. NisA, a 34 amino acid antimicrobial peptide, is used for the induction of a regulatory cascade starting with its binding to the membrane-bound histidine protein kinase (NisK), which upon binding autophosphorylates a conserved His residue in its cytoplasmatic domain for its activation. In the next step, the phosphate group from activated NisK is transferred to the intracellular response regulator (NisR), which becomes activated and, in turn, induces P_{nisA} , which controls the expression of the genes located downstream this promoter (Mierau and Kleerebezem, 2005; Morello *et al.*, 2008; Maischberger *et al.*, 2010). Interestingly, the NICE system can be easily adapted to food-grade production of recombinant proteins by, for example, exchanging the cassettes for antibiotic resistance routinely used as selection markers by other selectable markers, such as the complementation of genes that have been deleted from the host strain and that are essential for growth under certain conditions. This approach ensures that neither an antibiotic resistance gene nor an antibiotic is present in the proteins obtained from this recombinant system (Olempska-Beer *et al.*, 2006; Maischberger *et al.*, 2010).

The multibacteriocinogenic strain *Lb. curvatus* BCS35 isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) exerts a broad and strong antimicrobial spectrum against spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* (Chapter III). This antimicrobial activity is, at least, partially due to the production of the bacteriocins CurG14 and CurG15 (Chapters III and IV), which are both synthesized as 66-amino-acid prepeptides consisting of a 18-amino acid leader sequence and a 47 amino acid peptide, which constitutes the mature bacteriocin (Chapter IV). In previous works (Chapters IV and V), the *in vitro* safety of this strain, as well as its good performance for fresh fish biopreservation when applied either as protective culture or as food ingredient have been demonstrated. These results prompted interest in the quantification of bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35 as well as the development of heterologous hosts which could improve bacteriocin antimicrobial activity and/or production. In this work, we report the use of the NICE system for the production of CurG14 and CurG15 by recombinant *Lc. lactis* subsp. *cremoris* strains containing chimeras of the SP_{Usp45} fused to the mature bacteriocins. We also describe the development of sensitive and specific rabbit polyclonal antibodies against chemically synthesized peptides derived from the C-terminus of CurG14 and CurG15, and their use to detect and quantify bacteriocin production by the wild-type strain *Lb. curvatus* BCS35 and the recombinant lactococcal strains generated in this work.

VI.3. MATERIALS AND METHODS

VI.3.1. Bacterial strains, plasmids, media and culture conditions

The sources and relevant genotypes of microorganisms and plasmids used in this work are listed in Table VI.1. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35, isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) in a previous work (Chapter III), and the indicator strains *Pediococcus pentosaceus* FBB63, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* Lb706 and *Enterococcus faecium* P13 were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 30°C. The indicator strain *L. monocytogenes* CECT936 was propagated aerobically in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid) at 30°C. Lactococcal strains were grown aerobically in M17 broth (Oxoid) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) at 30°C. Agar plates were made by addition of 1.5% (wt/vol) agar (Oxoid) to the liquid media. The plasmid pNZ8048, containing the NisA-inducible promoter P_{nisA} and a chloramphenicol resistance marker, was used as expression vector (Kuipers *et al.*, 1998). Chloramphenicol (Cm, 5 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added to the cultures of recombinant *Lc. lactis* NZ9000 strains for selection of transformants. Unless otherwise stated, recombinant cultures of *Lc. lactis* NZ9000 were induced for the production of CurG14 or CurG15

Table VI.1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Source ^b and/or reference
Strains		
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> BCS35	Curvacin G14 (CurG14) (Sakacin P [SakP] variant), curvacin G15 (CurG15) (Sakacin X [SakX]), sakacin T (SakT), and sakacin Q (SakQ) producer	This work
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> LTH673	SakP and SakQ producer; indicator strain	Tichaczek <i>et al.</i> (1992), Mathiesen <i>et al.</i> (2005)
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> Lb706	Sakacin A (SakA) producer; indicator strain	Schillinger and Lücke (1989)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BB24	Nisin A (NisA) producer	DNBTA; Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	NIZO; Kuipers <i>et al.</i> (1998)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712; source of <i>usp45</i>	IFR; Gasson (1983)
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	Pediocin PA-1 (PedPA-1) producer; indicator strain	DNBTA; Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB63	Indicator strain	TNO
<i>Enterococcus faecium</i> P13	Enterocin P (EntP) producer; indicator strain	DNBTA; Cintas <i>et al.</i> (1997)
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT936	Serotype 1/2b; indicator strain	CECT
Plasmids		
pNZ8048	Cm ^r ; inducible expression vector carrying the <i>nisA</i> promoter (P_{nisA})	Kuipers <i>et al.</i> (1998)
pNUG14E	Cm ^r ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product D (SP_{Usp45} fused to mature <i>sppA</i>) under the control of P_{nisA}	This work
pNUG15E	Cm ^r ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product I (SP_{Usp45} fused to mature <i>sakX</i>) under the control of P_{nisA}	This work

^aCm^r, chloramphenicol resistance. ^bAbbreviations: DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); IFR, Institute of Food Research (Norwich, UK); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, The Netherlands).

when they reached an OD₆₀₀ of 0.5 using NisA-containing supernatants from *Lc. lactis* BB24 (NisA producer) cultures at a final concentration of 10 ng/ml. Cell-free culture supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 grown in MRS broth at 30°C until the stationary phase, and from the recombinant lactococcal strains were obtained by centrifugation of the cultures at 12,000 × g at 4°C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filter-sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp.; Bedford, MA, USA), and stored at –20°C until further use.

VI.3.2. Basic genetic techniques and enzymes

Total genomic DNA from *Lb. curvatus* BCS35 and *Lc. lactis* MG1363 was isolated with the Wizard Genomic DNA Purification Kit as recommended by the manufacturer (Promega Corp.; Madison, WI, USA). For plasmid DNA isolation from *Lc. lactis* NZ9000 recombinants, the cells were pre-treated with lysozyme (40 mg/ml) and mutanolysin (500 U/ml) at 37°C for 10 min before using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA restriction enzymes were used as recommended by the supplier (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA). Ligations were performed with T4 DNA ligase (Roche Diagnostics S. Lc., Madrid, Spain) following the supplier's instructions. Electrocompetent *Lc. lactis* NZ9000 cells were transformed according to the method described by Holo and Nes (1989) with a Gene Pulser and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

VI.3.3. PCR amplifications and nucleotide sequencing

Oligonucleotide primers used in this work (Table VI.2) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen S. A., Barcelona, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (at an appropriate temperature for 30 s), and elongation (68°C for 40 s), ending with a final extension step at 68°C for 7 min in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). PCR products and plasmids were analyzed by electrophoresis on 2 and 0.8% (wt/vol) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, respectively, at 90 V for 1 h, using the 100-bp DNA and the Supercoiled DNA ladders (Invitrogen) as molecular weight markers, respectively, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories S. A., Madrid, Spain) for image acquisition and computer analysis. The PCR-generated fragments were purified with the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of both strands of purified PCR products was done by the dideoxy chain terminating method (Sanger *et al.*, 1977), using an ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction kit with Ampli*Taq* DNA polymerase and dye-labeled terminators and an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) at the DNA Sequencing Service Sistemas Genómicos (Valencia, Spain).

Table VI.2. Primers and PCR products used in this study.

Primer or PCR product	Nucleotide sequence ^a (5'-3') or description	Fragment(s) amplified
Primers		
U45-1F- <i>Bsp</i> HI	GGAA <u>TCATG</u> AAAAAAAAAGATTATCTCAG	A, D, E, F, I and J
U45-2R-G14E	ACCATAATATTAGCGTAGACCCCTGACAAC	A
U45-2R-G15E	ACCGTAGTATTAGCGTAGACCCCTGACAAC	F
G14E-3F-U45-1	GGGGTCTACGCTAAATATTATGGTAACGGGTGACACTG	B
G14E-4R- <i>Kpn</i> I	CGCCGGTACCTTATTATTTATTCAGCCAGCGTTTC	B and D
G14E-3F-U45-2	GGGGTCTACGCTAAATATTATGGTAACGGTG	C
G14I-5R- <i>Kpn</i> I	GGCCGGTACCTGCTAATAGCCATATCTTATATTAG	C and E
G15E-3F-U45	GGGGTCTACGCTAAATACTACGGTAATGGATTG	G and H
G15E-4R- <i>Sac</i> I	CGCCGAGCTCTTAAGATTTCAGCCAGCAGC	G and I
G15I-5R- <i>Sac</i> I	CGCCGAGCTCTTAATAACCGTATCTAATATTG	H and J
NZPJ-F	TGTCGATAACGCGAGCATAA	Inserts cloned in pNZ8048
NZPJ-R	CAAAGCAACACGTGCTGTAA	Inserts cloned in pNZ8048
PCR products		Primers used
Fragment SP _{Usp45} (A)	99-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the Usp45 signal peptide (SP _{Usp45}) and the first four N-terminal amino acids of the mature CurG14 (<i>sppA</i>)	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/U45-2R-G14
Fragment G14E (B)	157-bp <i>Kpn</i> I fragment containing mature <i>sppA</i> and the last four amino acids of the SP _{Usp45}	G14E-3F-U45-1/G14E-4R- <i>Kpn</i> I
Fragment G14EI (C)	547-bp <i>Kpn</i> I fragment containing mature <i>sppA</i> and CurG14 immunity protein (<i>spiA</i>), and the last four C-terminal amino acids of the SP _{Usp45}	G14E-3F-U45-2/G14I-5R- <i>Kpn</i> I
Fragment SP _{Usp45} -G14E (D)	232-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Kpn</i> I fragment containing the SP _{usp45} fused to mature <i>sppA</i>	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/G14E-4R- <i>Kpn</i> I
Fragment SP _{Usp45} -G14EI (E)	622-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Kpn</i> I fragment containing the SP _{usp45} fused to mature <i>sppA</i> and <i>spiA</i>	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/G14I-5R- <i>Kpn</i> I
Fragment SP _{Usp45} (F)	99-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing SP _{Usp45} and the first four N-terminal amino acids of the mature CurG15 (<i>sakX</i>)	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/U45-2R-G15
Fragment G15E (G)	154-bp <i>Sac</i> I fragment containing mature <i>sakX</i> the last four C-terminal amino acids of the SP _{Usp45}	G15E-3F-U45/G15E-4R- <i>Sac</i> I
Fragment G15EI (H)	578-bp <i>Sac</i> I fragment containing mature <i>sakX</i> and CurG15 immunity protein (<i>sakI_x</i>) and the last four C-terminal amino acids of the SP _{Usp45}	G15E-3F-U45/G15I-5R- <i>Sac</i> I
Fragment SP _{Usp45} -G15E (I)	229-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Sac</i> I fragment containing SP _{Usp45} fused to mature <i>sakX</i>	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/G15E-4R- <i>Sac</i> I
Fragment SP _{Usp45} -G15EI (J)	653-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Sac</i> I fragment containing and the SP _{Usp45} fused to mature <i>sakX</i> and <i>sakI_x</i>	U45-1F- <i>Bsp</i> HI/G15I-5R- <i>Sac</i> I

^aCleavage sites for restriction enzymes are underlined.

VI.3.4. Construction of the recombinant plasmids derived from pNZ8048 and transformation in *Lc. lactis* NZ9000

The PCR products used for construction of the recombinant plasmids for heterologous production of CurG14 and CurG15 by *Lc. lactis* NZ9000 are listed in Table VI.2. Derivatives of plasmid pNZ8048 were constructed as follows (Fig. 6.1): primers U45-1F-*Bsp*HI and U45-2R-G14E were used for PCR amplification from total genomic DNA of *Lc. lactis* MG1363 of a 99-bp *Bsp*HI fragment (A) containing the nucleotides encoding the signal peptide of the Usp45 protein (SP_{Usp45}) and the first four N-terminal amino acids of the mature CurG14 (*sppA*). Primers G14E-3F-U45-1 and G14E-4R-*Kpn*I were used for PCR amplification from total genomic DNA of *Lb. curvatus* BCS35 of a 157-bp *Kpn*I fragment (B) containing the nucleotides encoding the mature CurG14 (*sppA*) and the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Similarly, primers G14E-3F-U45-2 and G14I-5R-*Kpn*I were used

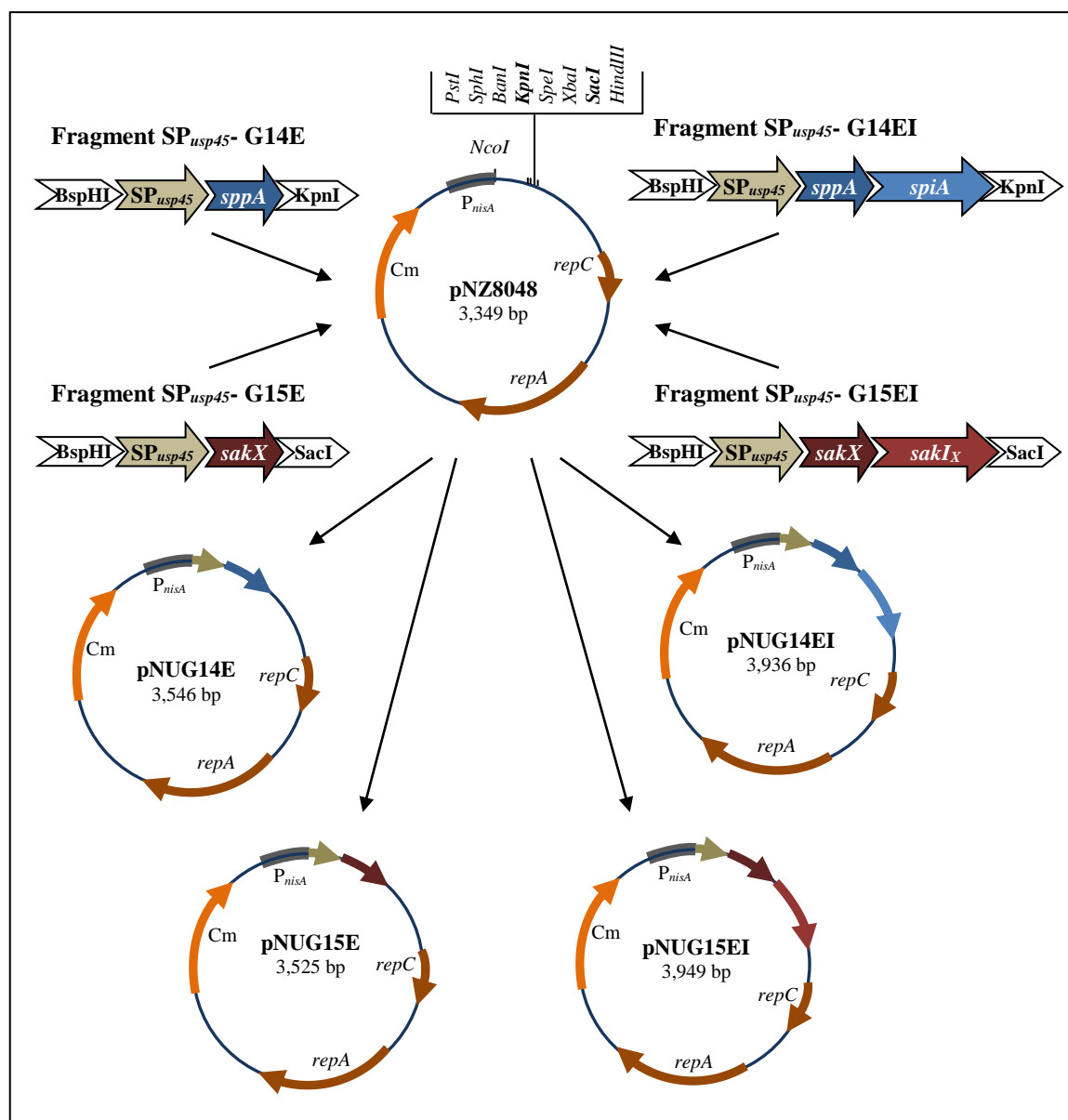


Figure 6.1. Construction strategy of the recombinant plasmids pNUG14E, pNUG15E, pNUG14EI and pNUG15EI, derived from pNZ8048. Plasmid sizes are given in base pairs (bp). Only restriction enzymes sites relevant for cloning are shown. *P_{nisA}*, NisA-inducible promoter; *repC* and *repA*, plasmid replication genes; *Cm*, chloramphenicol resistance gene.

for PCR amplification from the same DNA target of a 547-bp *KpnI* fragment (C) containing the nucleotides encoding the mature CurG14 (*sppA*) and its immunity protein (*spiA*) and the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Mixtures of fragments A and B and of fragments A and C were used as templates to amplify by PCR a 232-bp *BspHI*–*KpnI* fragment (D) and a 622-bp *BspHI*–*KpnI* fragment (E), using the primers pairs U45-1F-*BspHI*/G14E-4R-*KpnI* and U45-1F-*BspHI*/G14I-5R-*KpnI*, respectively. On the other hand, primers U45-1F-*BspHI* and U45-2R-G15E were used for the PCR amplification from the *Lc. lactis* MG1363 DNA of a 99-bp *BspHI* fragment (F) containing the nucleotides encoding the signal peptide of the Usp45 protein (SP_{Usp45}) and the first four N-terminal amino acids of the mature CurG15 (*sakX*). Subsequently, primers G15E-3F-U45 and G15E-4R-*SacI* were used for PCR amplification from total genomic DNA of *Lb. curvatus* BCS35 of a 154-bp *SacI*

fragment (G) containing the nucleotides encoding the mature CurG15 (*sakX*) and the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Likewise, primers G15E-3F-U45 and G15I-5R-*SacI* were used for PCR amplification from the same DNA template of a 578-bp *SacI* fragment (H) containing the nucleotides encoding the mature CurG15 (*sakX*) and its immunity protein (*sakIX*), and the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Mixtures of fragments F and G and of fragments F and H were used as templates to amplify by PCR a 229-bp *BspHI*-*SacI* fragment (I) and a 653-bp *BspHI*-*SacI* fragment (J) using the primers pairs U45-1F-*BspHI*/G15E-4R-*SacI* and U45-1F-*BspHI*/G15I-5R-*SacI*, respectively. The purified fragments D, E, I and J were digested with the corresponding restriction enzymes and ligated into pNZ8048, previously digested with *NcoI* and *KpnI*, and *NcoI* and *SacI* for CurG14 and CurG15 fusions, respectively. The ligation mixtures were used to transform *Lc. lactis* NZ9000 competent cells, and transformants were selected onto GM17 plates with Cm (5 µg/ml) after incubation at 30°C for 24 h. The plasmid pNZ8048 was also transformed into *Lc. lactis* NZ9000, and the resulting *Lc. lactis* NZ9000-C strain was used as negative control.

The recombinant plasmids pNUG14E and pNUG15E were checked by PCR amplification of fragments of the expected size using the insert specific primer pairs U45-1F-*BspHI*/G14E-4R-*KpnI* and U45-1F-*BspHI*/G15E-4R-*SacI*, producing 223- and 220-bp fragments, respectively, and the vector specific primer pair NZPJ-F/NZPJ-R, which produces 438- and 417-bp fragments from the recombinant plasmids containing CurG14 and CurG15 fusions, respectively. The latter products were also subjected to nucleotide sequencing as described above.

VI.3.5. Bacteriocin assays

Detection of the direct antimicrobial activity of individual colonies of lactococcal recombinants was performed by a stab-on agar-test (SOAT) using a modification of the method described by Cintas *et al.* (1995). Briefly, bacterial transformants were stabbed onto GM17 plates supplemented with Cm (5 µg/ml), and incubated at 30°C for 5 h. Then, to induce bacteriocin production, 10 ml of GM17 soft agar (0.8%, wt/vol) supplemented with NisA (10 ng/ml) was poured onto the plates. Afterwards, 40 ml of the corresponding soft agar media containing about 1×10^5 cfu/ml of the indicator strain (*L. monocytogenes* CECT936, *E. faecium* P13 or *Lb. sakei* Lb706) was poured onto the plates. After incubation at 30°C for 16-24 h, the plates were checked for inhibition zones (absence of visible microbial growth around the spotted cultures).

The antimicrobial activity of cell-free culture supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 and the recombinant lactococcal strains was determined by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995) and a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000), as previously described (Chapter III and IV, respectively). In the ADT, after incubation, the antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells. In the MPA, one bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of a supernatant causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). Cells

transformed with the empty vector (*Lc. lactis* NZ9000-C [pNZ8048]), were used as negative controls of antimicrobial activity.

VI.3.6. Production of specific anti-CurG14 and anti-CurG15 polyclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

VI.3.6.1. Design and synthesis of antigenic peptides

The immunogenic potential of CurG14 and CurG15 was evaluated according to their hydrophilicity and antigenic index using a sequence analysis software package (Devereux *et al.*, 1984). The synthetic peptides PB1 and PB2 (derived from the C-terminus of CurG14 and CurG15, respectively) were used as antigens for the generation of antibodies. The amino acid sequences of the synthetic peptides were NH₂-CATGGNAGWNK-COOH (peptide PB1) and NH₂-CLTTGGAAGWKS-COOH (peptide PB2), where cysteine residues were added to the specific amino acid sequence. Synthetic peptides were obtained from Invitrogen Ltd. (Paisley, Scotland, UK); peptide purity (>95%) and identity were confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry, respectively.

VI.3.6.2. Preparation of the immunoconjugates and rabbit-immunization

Peptides PB1 and PB2 were conjugated to the carrier protein keyhole limpet haemocyanin (KLH) (PB1-KLH and PB2-KLH; 1:2 [wt/wt]) by 1-ethyl-3(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hypochloride (EDC) coupling using the Imject Immunogen EDC kit (Perbio Science UK Ltd., Cheshire, UK) to be used as immunogens. Rabbit (New Zealand White females) were immunized with six doses of PB1-KLH or PB2-KLH emulsified with an equal volume of Freund's adjuvant (Sigma Chemical Company), as previously described (Gutiérrez *et al.*, 2004). Serum was obtained after overnight incubation of blood at 4°C and centrifugation at 1,000 × *g* at room temperature for 15 min, and stored at -20°C until use.

VI.3.6.3. ELISA

Antiserum titration and determination of the specificity and sensitivity of the anti-CurG14 and anti-CurG15 antibodies were performed by ELISA as previously described (Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado, 2006b; Borrero *et al.*, 2011a). For detection and quantification of CurG14 and CurG15 in the supernatants from the producer strains, a noncompetitive indirect ELISA (NCI-ELISA) was designed. Briefly, flat-bottom 96-well polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with known concentrations of purified CurG14 and CurG15 or with cell-free culture supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 or the *Lc. lactis* recombinants in 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) (coating buffer [CB]). After this and each subsequent step, the coated plates were washed nine times with 0.05% Tween 20 in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). To reduce nonspecific binding, the wells were blocked with 300 µl of 1% (wt/vol) ovalbumin (OA) (grade III) in PBS (OA-PBS) at 37°C for 1 h. Next, 50 µl of anti-PB1-KLH or anti-PB2-KLH

(diluted 1:100 and 1:500, respectively, in PBS) were added, and the plates were incubated at 37°C for 1 h. Goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) peroxidase-labelled conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA) was diluted 1:500 in OA-PBS and 100 µl were added to each well. Next, 100 µl of 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) (Sigma Chemical Company) solution with 0.066% (vol/vol) H₂O₂ was added and the plates were incubated at room temperature in the dark, after which the reaction was stopped by addition of 45.7 mM citric acid plus 0.1% (wt/vol) sodium azide. The amount of bound peroxidase was determined measuring the absorbance at 405 nm in a Labsystems iEMS reader (Helsinki, Finland) with a built-in software package for data analysis. Curves were obtained by plotting absorbance against the logarithm of the analyte concentration. Sigmoid curves were fitted to a four parameter logistic equation by using the Labsystems software package (Genesis version 1.60).

The presence of CurG14 and CurG15 in the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35, *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) transformants was detected using the bacteriocin specific antibodies generated in this work and an NCI-ELISA, essentially as aforementioned. Bacteriocin concentrations were determined from the standard curves obtained by plotting the absorbance values at 405 nm obtained in an NCI-ELISA carried out using plates coated with known concentrations (estimated using the extinction coefficient) of purified (see below) CurG14 and CurG15 and two-fold dilutions of the control supernatant (obtained from an overnight culture of *Lb. curvatus* BCS35 grown in MRS broth at 30°C), and the bacteriocin-specific antibodies. All plates included control wells coated with: (i) CB:GM17 broth, to set the background level of the plate, and (ii) six two-fold dilutions of the control supernatant to set a standard curve within each plate.

VI.3.7. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by *Lc. lactis* NZ9000 recombinant strains and *Lb. curvatus* BCS35

Production of active CurG14 and CurG15 by the recombinant lactococcal strains was first analyzed by checking the direct antimicrobial activity of individual colonies of *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG14E), *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG14EI), *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG15E), and *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG15EI) transformants by a SOAT using *L. monocytogenes* CECT936, *P. pentosaceus* FBB63 and *E. faecium* P13 as indicator microorganisms.

In order to select for the recombinant clones that would be subjected to further characterization, the antimicrobial activity of several supernatants from *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG15E) transformants grown in GM17 broth supplemented with Cm (5 µg/ml) at 30°C induced with NisA at an OD₆₀₀ of 0.5, and further incubated for 1.5, 3 and 5 h, was determined by duplicate by an ADT and a MPA using *L. monocytogenes* CECT936, *E. faecium* P13 and *Lb. sakei* Lb706 as indicator microorganisms.

Finally, to establish the optimum conditions for bacteriocin production by the selected *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) transformants, these strains were

grown in GM17 broth supplemented with Cm (5 µg/ml) at 30°C under aerobic conditions, induced with NisA at different OD₆₀₀ (0.3, 0.5, and 0.9), and further incubated for 1.5, 3 and 5 h. Cell growth (OD₆₀₀), culture pH and antimicrobial activity of the supernatants, as measured by an ADT and a MPA using *L. monocytogenes* CECT936, *Lb. sakei* Lb706 and *E. faecium* P13 as indicator microorganisms, and bacteriocin production measured by an NCI-ELISA, were determined periodically by duplicate.

On the other hand, to establish the optimum conditions for bacteriocin production by *Lb. curvatus* BCS35, this strain was firstly grown under aerobic conditions in MRS and GM17 broth at 30°C for 60 h, and bacterial growth (OD₆₀₀), culture pH and bacteriocin activity were determined periodically by duplicate. Subsequently, *Lb. curvatus* BCS35 was grown in MRS broth at 4 and 8 °C for 542 h (23 days), at 16 and 25 °C for 186 h (8 days), and at 30 and 37 °C for 60 h. Cell growth (OD₆₀₀), culture pH, and bacteriocin activity and concentration, measured by an MPA using *P. pentosaceus* FBB63 as indicator microorganism and an NCI-ELISA, respectively, were determined periodically by duplicate.

VI.3.8. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant CurG14 and CurG15

CurG14 and CurG15 heterologously produced by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E), respectively, were purified as previously described (Cintas *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). All the chromatographic equipment was obtained from GE Life Sciences (Barcelona, Spain). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-l cultures grown in GM17 broth with Cm (5 µg/ml) were subjected to precipitation with ammonium sulfate (50% saturation, wt/vol) (Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain), and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns). The obtained fractions were further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reversed-phase chromatography (PepRPC HR 5/5) in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC) (GE Healthcare Life Science, Barcelona, Spain). Bacteriocins were eluted with a linear gradient of 2% (vol/vol) 2-propanol (Merck) in aqueous 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) (Merck) (2-propanol-TFA) at a flow rate of 0.5 ml/min. During the purification process, the antimicrobial activity of the obtained fractions was determined by an MPA using *L. monocytogenes* CECT936 as indicator microorganism. Fractions displaying a high and specific bacteriocin activity were pulled together and rechromatographed on the same reversed-phase column until chromatographically pure bacteriocins were obtained. Aliquots of the purified fractions were either stored in 2-propanol-TFA at -20°C until further use or subjected to mass spectrum analysis by using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Mass Spectrum Service of the Centro de Genómica y Proteómica (Madrid, Spain). The concentration of purified bacteriocins was determined from their UV absorbance at 280 (*A*₂₈₀) and molar extinction coefficients, and by a NCI-ELISA using polyclonal antibodies with predetermined specificity for CurG14 and CurG15 as described above.

VI.4. RESULTS

VI.4.1. Construction of recombinant *Lc. lactis* hosts producing CurG14 and CurG15

The recombinant plasmids pNUG14E, pNUG15E, pNUG14EI and pNUG15EI, intended for the expression of the native bacteriocin structural genes *sppA* and *sakX*, with or without their immunity genes, under the control of P_{nisA} , were constructed as outlined in Fig. 6.1. The 232-bp *BspHI/KpnI* and 229-bp *BspHI/SacI* fragments containing the nucleotide sequences encoding the SP_{Usp45} fused to that encoding mature CurG14 and CurG15, respectively, were successfully inserted into pNZ8048, resulting in the recombinant plasmids pNUG14E ($SP_{Usp45}:sppA$) and pNUG15E ($SP_{Usp45}:sakX$), respectively. By using a similar approach, the 622-bp *BspHI/KpnI* and 653-bp *BspHI/SacI* fragments containing the nucleotide sequences encoding the SP_{Usp45} fused to that encoding mature CurG14 and CurG15 together with their corresponding immunity proteins *spiA* and *sakI_x*, respectively, were inserted into pNZ8048. Electroporation of the recombinant plasmids pNUG14E, pNUG15E, pNUG14EI and pNUG15EI into *Lc. lactis* NZ9000 competent cells resulted in the growth of Cm-resistant colonies in all the cases. In the case of the cells transformed with the constructs carrying the structural genes of CurG14 and CurG15, 150 and 45 colonies of *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG15E), respectively, were obtained, from which 3 (2%) and 16 (36%) colonies, respectively, showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* CECT936, *E. faecium* P13 and *Lb. sakei* Lb706. On the other hand, despite several transformation attempts, the colonies obtained from the cells transformed with pNUG14EI and pNUG15EI (a mean of more than 200 and around 30, respectively), did not show antimicrobial activity against any of the indicator microorganisms tested. DNA sequencing of the PCR products obtained with vector and insert specific primers confirmed that the constructs pNUG14E and pNUG15E were correct.

VI.4.2. Antimicrobial activity of recombinant strains

In order to select the recombinant *Lc. lactis* NZ9000 strains that would be subjected to further characterization, the antimicrobial activity present in the supernatants of three *Lc. lactis* NZ9000 transformants expressing CurG14 (*Lc. lactis* NZ9000-58E, *Lc. lactis* NZ9000-69E and *Lc. lactis* NZ9000-73E) or CurG15 (*Lc. lactis* NZ9000-12E, *Lc. lactis* NZ9000-20E and *Lc. lactis* NZ9000-31E) induced with NisA at an OD_{600} of 0.5 and grown for 1.5, 3 and 5 h after induction, was quantified by an ADT and an MPA, respectively. As shown in Tables VI.3 and VI.4, the three transformants showed antimicrobial activity at all the time points assayed, while the control strain *Lc. lactis* NZ9000-C (pNZ8048) did not display any antagonistic effect under the same conditions (data not shown). In general, the antimicrobial activity of both bacteriocins against *L. monocytogenes* CECT936 was higher than against *E. faecium* P13 and *Lb. sakei* Lb706. The maximum antimicrobial activity of both CurG14 and CurG15 was detected at 3 h of growth after induction for all recombinant strains except in the case of *Lc. lactis* NZ9000-58E (pNUG14E), for which the antimicrobial activity against *E. faecium* P13 was slightly higher at 5 h of growth after induction. The stability of the antimicrobial activity of the CurG14 produced by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-73E (pNUG14E) against *L.*

monocytogenes CECT936 (≤ 57 and 55% stability, respectively) was the lowest one observed, while that of the antimicrobial activity exerted by CurG15 produced by all *Lc. lactis* strains against the two indicators assayed ranged from 92 to 99%. Considering these results, *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E), showing the maximum antimicrobial activity against the two tested indicators, were selected for further characterization of bacteriocin production.

Table VI.3. Antimicrobial activity of supernatants from *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG14E) recombinant strains at different times after induction at an OD₆₀₀ of 0.5.

Recombinant strains	Time (h) of growth after induction	Indicator microorganisms					
		<i>L. monocytogenes</i> CECT936			<i>E. faecium</i> P13		
		MPA ^a (BU/ml)	ADT ^b		MPA (BU/ml)	ADT	
			Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)
<i>Lc. lactis</i> NZ9000 (pNUG14E)	58E	0	-	-	-	-	-
		1.5	660	10.2 s2 R	1,069	135	6.8 s
		3	1,294	11.8 s2 R	1,622	180	6.9 s
		5	1,127	11.7 s2 R	1,585	195	6.9 s
	69E	0	-	-	-	-	-
		1.5	920	11.0 s2 R	1,335	159	6.9 s
		3	> 2,560	13.2 s2 R	2,171	301	8.2 s
		5	1,453	12.6 s2 R	1,928	189	7.9 s
	73E	0	-	-	-	-	-
		1.5	790	9.6 s2 R	882	140	6.4 s
		3	> 2,560	12.9 s2 R	2,049	167	7.1 s
		5	1,403	12.2 s2 R	1,773	129	6.8 s

^aAntimicrobial activity (BU/ml) of cell-free culture supernatants as determined by an MPA. ^bAntimicrobial activity (mm) as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: s=sharp, s2=very sharp, and R=with resistant cells.

Table VI.4. Antimicrobial activity of supernatants from *Lc. lactis* NZ9000 (pNUG15E) recombinant strains at different times after induction at an OD₆₀₀ of 0.5.

Recombinant strains	Time (h) of growth after induction	Indicator microorganisms					
		<i>L. monocytogenes</i> CECT936			<i>Lb. sakei</i> Lb706		
		MPA ^a (BU/ml)	ADT ^b		MPA (BU/ml)	ADT	
			Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)
<i>Lc. lactis</i> NZ9000 (pNUG15E)	12E	0	-	-	-	-	-
		1.5	22,376	23.2 s2	7,889	229	8.7 s
		3	24,750	25.0 s2	9,252	250	10.9 s
		5	23,562	24.2 s2	8,634	230	10.3 s
	20E	0	-	-	-	-	-
		1.5	22,150	23.0 s2	7,744	230	8.6 s
		3	23,340	24.2 s2	8,634	232	10.4 s
		5	22,598	23.6 s2	8,183	230	9.5 s
	31E	0	-	-	-	-	-
		1.5	21,781	22.4 s2	7,316	229	6.3 s
		3	23,289	24.0 s2	8,482	231	9.9 s
		5	22,490	23.7 s2	8,258	230	9.5 s

^{a,b}As in Table VI.3.

VI.4.3. Purification and mass spectrometry of CurG14 and CurG15 produced by the recombinant strains

The results of the purification of CurG14 and CurG15 produced by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E), respectively, are summarized in Table VI.5. Ammonium sulfate precipitation of the proteins from cell-free culture supernatants from *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) allowed an increase in specific antimicrobial activity of 18- and 29-fold, respectively, and a recovery of 144 and 217%, respectively, of the initial bacteriocin activity found in the respective supernatants (Table VI.5). The ammonium sulfate precipitates were desalted by gel filtration prior to cation-exchange chromatography, resulting in fractions with 55 and 54%, respectively, of the initial antimicrobial activity found in the supernatants, and an increase in specific antimicrobial activity of 898- and 1,174-fold, respectively. The fractions eluted from the hydrophobic-interaction columns showed a recovery of 60 and 28% of the antimicrobial activity found in the supernatants, and a 9,119- and 2,929-fold increase in specific antimicrobial activity, respectively. The last RP-FPLC purification step resulted, in both cases, in a major well-separated absorbance peak, with a final specific antimicrobial activity of 129,258- and 54,840-fold, respectively, greater than that of the supernatants, representing a recovery of 11 and 13%, respectively, of the initial antimicrobial activity. The amount of recombinant CurG14 and CurG15 obtained after the purification process was, approximately, 1.1 and 1.4 μg , as determined by a NCI-ELISA, which represents only a 0.07 and 0.02 %, respectively, of the original bacteriocin amounts present in the supernatant. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the recombinant CurG14 and CurG15 obtained in the fractions from the last RP-FPLC showed two major peaks of 4,461.53 and 4,363.57 Da (Fig. 6.2), respectively.

Table IV.5. Purification of CurG14 and CurG15 produced by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E), respectively.

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total antimicrobial activity (BU) ^b	Specific antimicrobial activity (BU/ A_{254}) ^c	Increase in specific antimicrobial activity (fold) ^d	Total antimicrobial activity (%)	Curvacin yield (ng) ^e	Curvacin yield (%)	Curvacin specific activity (BU/ng) ^f
<i>Lc. lactis</i> NZ9000-69E (pNUG14E)									
Culture supernatant	1,000	22,800	35,340	2	1	100	1,499,537	100	0.024
Ammonium sulfate precipitation	100	1,850	50,991	28	18	144	252,339	17	0.202
Gel filtration chromatography	200	221	32,203	146	94	91	406,417	27	0.079
Cation-exchange chromatography	50	14	19,481	1,392	898	55	89,680	6	0.217
Hydrophobic-interaction chromatography	10	1.5	21,202	14,135	9,119	60	28,254	1.9	0.750
Reversed-phase chromatography									
CurG14	1.400	0.020	4,007	200,350	129,258	11	1,088	0.07	3.684
<i>Lc. lactis</i> NZ9000-12E (pNUG15E)									
Culture supernatant	1,000	34,500	45,256	1	1	100	9,061,882	100	0.005
Ammonium sulfate precipitation	100	2,540	98,075	39	29	217	102,924,949	1,136	0.001
Gel filtration chromatography	200	890	44,057	50	38	97	1,308,435	14	0.034
Cation-exchange chromatography	50	16	24,649	1,541	1,174	54	454,342	5	0.054
Hydrophobic-interaction chromatography	10	3.3	12,678	3,842	2,929	28	128,445	1.4	0.099
Reversed-phase chromatography									
CurG15	1.200	0.080	5,755	71,938	54,840	13	1,372	0.02	4.196

^aAbsorbance at 254 nm (A_{254}) multiplied by the volume in milliliters. ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA against *L. monocytogenes* CECT936, multiplied by the total volume in milliliters. ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total antimicrobial activity (BU) divided by the total A_{254} . ^dSpecific antimicrobial activity of a fraction (BU/ A_{254}) divided by the specific antimicrobial activity of the culture supernatant (BU/ A_{254}). ^eCurG14 and CurG15 concentrations as determined by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for CurG14 and CurG15. ^fSpecific antimicrobial activity expressed as the total activity (BU) divided by the curvacin yield (ng).

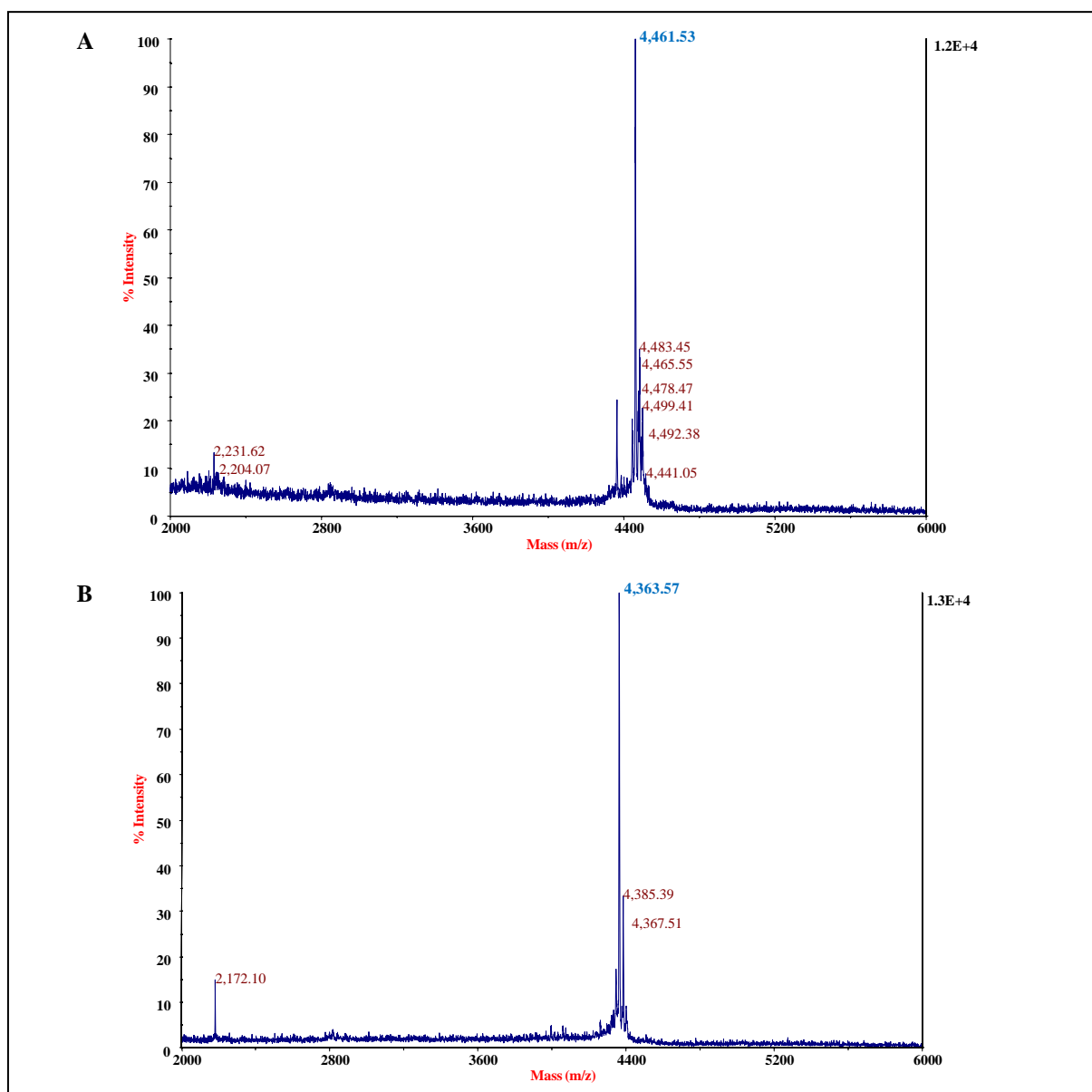


Figure 6.2. Mass spectrometry analysis of purified CurG14 (A) and CurG15 (B) from *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E), respectively.

VI.4.4. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by *Lc. lactis* NZ9000 recombinant strains

In order to determine the best conditions for bacteriocin antimicrobial activity and production by the selected recombinants, supernatants from cultures induced with NisA at different OD₆₀₀ and incubated 2, 3 and 5 h were analyzed by an ADT, an MPA and an NCI-ELISA. For both CurG14 and CurG15, maximum antimicrobial activity and production were detected in cultures induced at an OD₆₀₀ of 0.5, and after 3 hours of growth following induction (Tables VI.6 and VI.7). The maximum antimicrobial activity of CurG14 and CurG15 against *L. monocytogenes* CECT936 was 5.5- and 94-fold higher than against *E. faecium* P13 and *Lb. sakei* Lb706, respectively. On the other hand, the maximum concentrations of CurG14 and CurG15 produced by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and

Lc. lactis NZ9000-12E (pNUG15E) where 4,896 and 17,149 ng/ml (Tables VI.6 and VI.7), respectively. It should be noted that the influence of the OD₆₀₀ at which the cultures were induced on the antimicrobial activity and production was different for each bacteriocin. In this respect, the induction at an OD₆₀₀ of 0.9 resulted in a very low production of CurG15 compared with that at 0.5 and 0.3, regardless of the growth time after induction (Table VI.7). However, for CurG14, growth for 2 and 3 h after induction at an OD₆₀₀ of 0.9 resulted in a higher bacteriocin production than at 0.3 (Table VI.6).

Table VI.6. Antimicrobial activity and production of CurG14 by *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E).

OD ₆₀₀ of induction	Growth time (h) after induction	CurG14 concentration ^a (ng/ml)	Indicator microorganisms					
			<i>L. monocytogenes</i> CECT936			<i>E. faecium</i> P13		
			MPA ^b (BU/ml)	ADT ^c		MPA (BU/ml)	ADT	
				Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)
0.3	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	654	320	8.3 s2	517	-	-	-
	3	898	440	9.6 s2	882	124	6.3 s	58
	5	817	400	9.0 s2	707	122	6.3 s	58
0.5	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	2,554	1,245	11.4 s2	1,476	168	7.1 s	226
	3	4,896	2,530	13.0 s2	2,089	461	9.2 s	764
	5	4,433	2,200	12.8 s2	2,008	172	7.9 s	415
0.9	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	1,302	659	10.0 s2	1,005	142	6.6 s	119
	3	972	480	9.8 s2	943	134	6.4 s	78
	5	387	-	7.3 s2	272	-	-	-

^aCurG14 concentration (ng/ml) calculated by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for CurG14. ^bAntimicrobial activity (BU/ml) of cell-free culture supernatants as determined by an MPA. ^cAntimicrobial activity (mm) as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: s=sharp and s2=very sharp.

Table VI.7. Antimicrobial activity and production of CurG15 by *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E).

OD ₆₀₀	Growth time (h) after induction	CurG15 concentration ^a (ng/ml)	Indicator microorganisms					
			<i>L. monocytogenes</i> CECT936			<i>Lb. sakei</i> Lb706		
			MPA ^b (BU/ml)	ADT ^c		MPA (BU/ml)	ADT	
				Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)		Diameter (mm)	Area (mm ² /ml)
0.3	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	14,987	19,976	22.0 s2	7,037	-	-	-
	3	15,643	20,785	22.9 s2	7,672	190	8.7 s	623
	5	16,243	21,580	23.4 s2	8,558	215	9.3 s	793
0.5	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	16,389	21,654	23.5 s2	8,109	187	8.3 s	517
	3	17,149	22,843	23.9 s2	8,407	243	9.9 s	974
	5	16,721	22,170	23.6 s2	8,183	210	8.7 s	623
0.9	0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	174	-	6.3 s	58	-	-	-
	3	324	403	11.7 s	1,585	-	-	-
	5	198	385	10.0 s	1,005	-	-	-

^aCurG15 concentration (ng/ml) calculated by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for CurG15. ^{b,c}As in Table VI.6

VI.4.5. Microbiological and immunochemical detection and quantification of CurG14 and CurG15 production by *Lb. curvatus* BCS35

In order to select the most appropriate medium for bacteriocin production by *Lb. curvatus* BCS35, this strain was firstly grown in MRS and GM17 broth at 30°C under aerobic conditions for 60 h. The results obtained showed that bacterial growth (OD_{600}) and bacteriocin activity were higher in MRS than in GM17 broth (Fig. 6.3), while final pH of the culture was slightly lower in MRS than in GM17 broth (results not shown). Subsequently, the influence of temperature in the range of 4-37°C in bacterial growth and pH of *Lb. curvatus* BCS35 cultures grown in MRS broth, and in antimicrobial activity and bacteriocin concentration present in their supernatants was assessed. *Lb. curvatus* BCS35 grew at all the assayed temperatures, reaching an OD_{600} of 0.7-1.1 at the end of the experiment. (Fig. 6.4 and Table VI.8). The initial pH of the medium (6.2) dropped gradually to 4.2-4.8 at the end of the incubation period (results not shown).

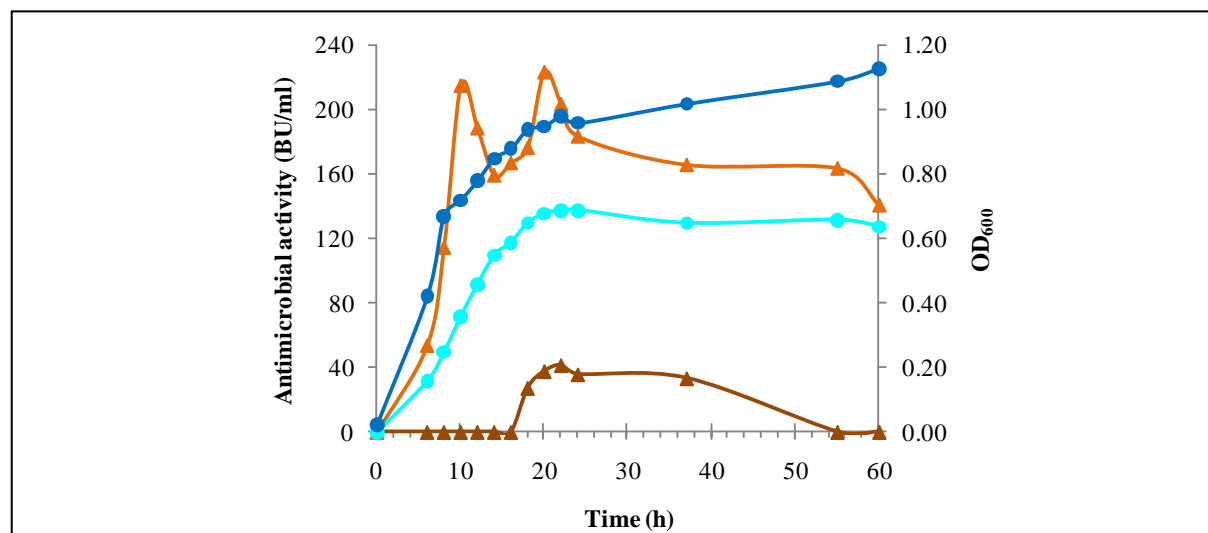


Figure 6.3. Bacterial growth (OD_{600}) (MRS broth [—●—] and GM17 broth [—●—]), and antimicrobial activity (BU/ml) (MRS broth [—▲—] and GM17 broth [—▲—]) of *Lb. curvatus* BCS35 cultures grown at 30°C.

The influence of temperature on the antimicrobial activity present in *Lb. curvatus* BCS35 supernatants is shown in Fig. 6.4 and Table VI.6. The highest antimicrobial activity was observed at 18°C (236 BU/ml), followed by that measured at 30, 25, 8, 37 and 4°C, which represent a 94.9, 87.7, 85.6, 55.1 and 44.1%, respectively, of that quantified at 18°C. Maximal antimicrobial activity at 4 and 25°C was coincident (at 327 and 20 h, respectively) with maximum CurG14 and CurG15 concentrations, respectively; whilst at 8 and 18°C maximal antimicrobial activity occurred after (at 379 and 58 h, respectively) the maximum concentration of both bacteriocins had been achieved, and at 30°C occurred (at 20 h) before CurG15 and after CurG14 maximum concentration. However at 37°C, maximal antimicrobial activity was achieved before (at 33 h) any of the bacteriocins had attained their maximum concentration (Table VI.8).

Concerning bacteriocin production, it should be noted that, in general, the production of CurG14 and CurG15 was parallel to cell growth, starting at the beginning of the exponential growth phase, and

reaching maximum concentrations at the end of this stage (Fig. 6.4 B-F), except at 37°C where the maximum production of both bacteriocins was detected during the stationary phase (Fig. 6.4 A). The production of CurG14 was higher than that of CurG15 at 30, 25 and 18°C, while the contrary was true at 8 and 4°C, and after 36 h of growth at 37°C. The maximum production of CurG14 (Table VI.8) was found at 30°C (243 ng/ml), followed by that obtained at 25, 18 and 37°C, which represent 77.4, 44.0 and 35.4% of that quantified at 30°C. For CurG15, the maximum production was found at 18°C (4,356 ng/ml), followed by that obtained at 37, 30 and 25°C, which constitute 73.0, 28.1 and 13.0% of that quantified at 18°C. At 8 and 4°C, production of both bacteriocins was significantly lower (for CurG14, 3.3 and 2.5% of that quantified at 30°C, respectively; and for CurG15, aprox. 0.3% of that quantified at 18°C, for both temperatures).

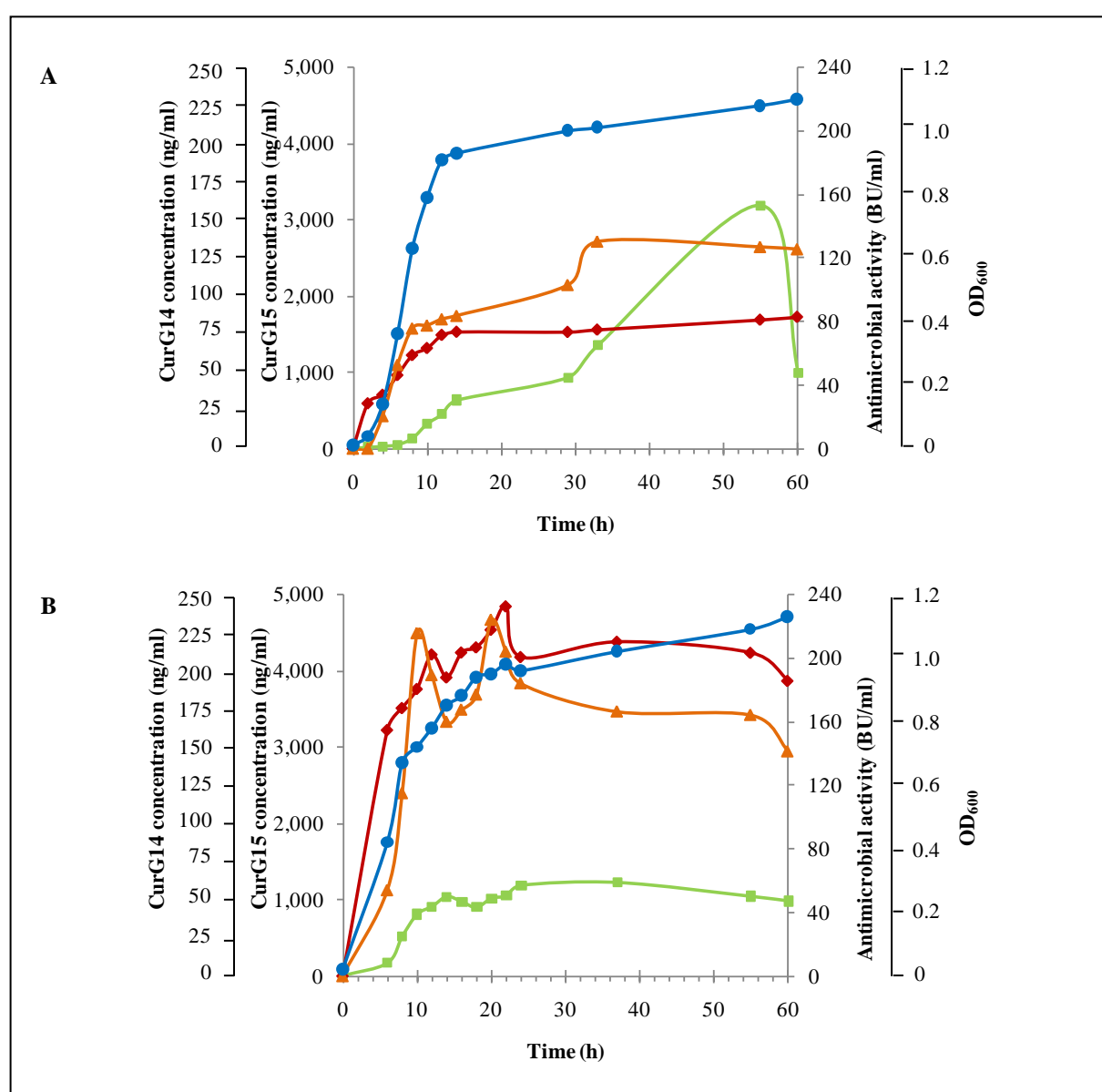


Figure 6.4. Bacterial growth (OD₆₀₀) (●), antimicrobial activity (BU/ml) (▲) and concentration (ng/ml) of CurG14 (◆) and CurG15 (■) in supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 grown in MRS broth at 37 (A), 30 (B), 25 (C), 18 (D), 8 (E) and 4°C (F).

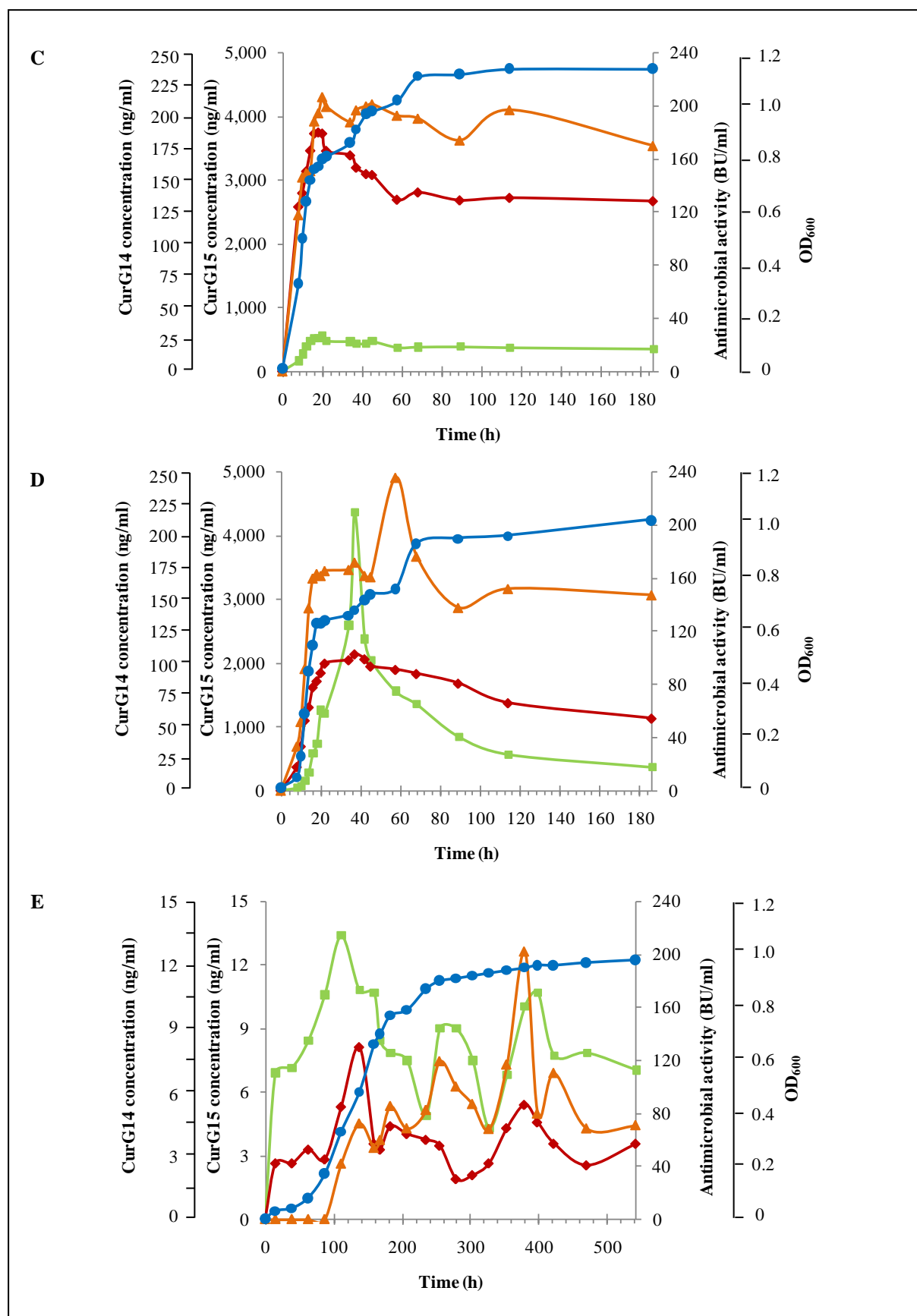


Figure 6.4. Continued.

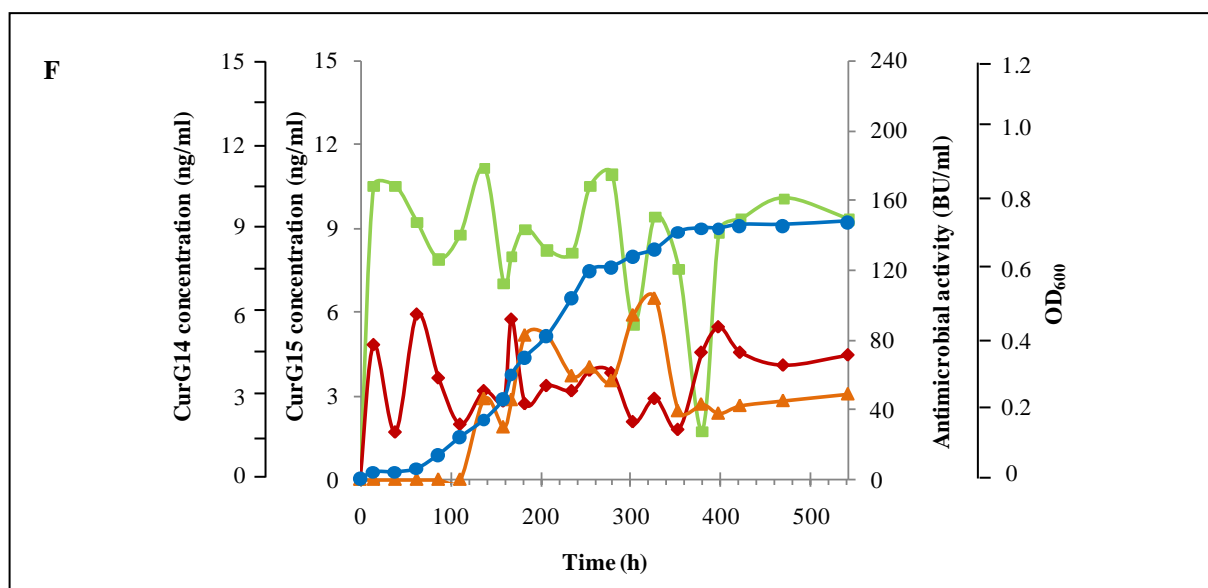


Figure 6.4. Continued.

Table VI.8. Maximum bacterial growth, antimicrobial activity and bacteriocin production by *Lb. curvatus* BCS35 grown in MRS broth at different temperatures.

Temperature (°C)	Maximum bacterial growth ^a and growth time (h) ^b	Maximum antimicrobial activity (BU/ml) ^c and growth time (h) ^b		Maximum curvacin concentration (ng/ml) ^d and growth time (h) ^b	
		<i>P. pentosaceus</i>	FBB63	CurG14	CurG15
	OD ₆₀₀				
4	0.74 (542)	104 (327)		6 (327)	11 (138)
8	0.98 (542)	202 (379)		8 (138)	13 (111)
18	1.02 (186)	236 (58)		107 (37)	4,356 (37)
25	1.14 (114-186)	207 (20)		188 (18)	564 (20)
32	1.13 (60)	224 (20)		243 (22)	1,223 (37)
37	1.10 (60)	130 (33)		86 (60)	3,181 (55)

^aBacterial growth as determined by OD₆₀₀. ^bNumbers in parentheses refer to the growth time (h) at which maximum curvacin concentration, antimicrobial activity or bacterial growth was achieved. ^cAntimicrobial activity (BU/ml) of cell-free culture supernatants as determined by an MPA. ^dCurG14 and CurG15 concentrations (ng/ml) calculated by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for CurG14 and CurG15, respectively.

VI.5. DISCUSSION

Many bacteriocins are more active and show a broader spectrum of antimicrobial activity against pathogenic and drug-resistant Gram-positive bacteria than conventional antibiotics, yet display no toxicity towards eukaryotic cells. Specifically, class IIa bacteriocins have been primarily explored as natural food preservatives, since they target a broad spectrum of bacteria, exhibiting high levels of

activity against *L. monocytogenes* and other food-borne pathogens like *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* (Cintas *et al.*, 1998b; Cotter *et al.*, 2005). Additionally, there is much interest in investigating the application of these peptides as therapeutic antimicrobial agents against several relevant human pathogens, such as vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Millette *et al.*, 2008; Sit and Vederas, 2008; Svetoch *et al.*, 2008; Lohans and Vederas, 2012). However, for any potential use of class IIa bacteriocins, an inexpensive method for the production of large quantities and a satisfactory yield of the fermentation process must be available, otherwise production cost will be high. In this context, the exploration of heterologous microbial systems for the production of bacteriocins offers a promising means for producing larger amounts of the peptide of interest (Lohans and Vederas, 2012). In addition, the development of efficient procedures for detection and quantification of bacteriocins in different substrates is also required for their industrial application (Criado, 2006; Sánchez *et al.* 2008; Borrero *et al.*, 2011b).

To date, many expression systems have been developed to produce recombinant proteins for various biotechnological applications. Amongst prokaryotic systems, *Escherichia coli* has been frequently used as a cell-factory (Jana *et al.*, 2005). However, in this host, heterologous proteins are generally produced intracellularly, often involving expensive and problematic downstream purification processes. In contrast, heterologous proteins produced by Gram-positive hosts can be easily secreted into the medium, either by the Sec-system or by a dedicated transported system, thus facilitating their purification and reducing the efforts and cost of protein purification. Therefore, protein secretion is a preferred means of protein expression in the development of LAB as cell factories for production of biologically active compounds (Mathiesen *et al.*, 2008; Morello *et al.*, 2008). At this respect, some LAB species such as *Lc. lactis* are an attractive option for heterologous protein secretion and overproduction of food-relevant products (Olempska-Beer *et al.*, 2006). In this context, the production of bacteriocins by heterologous LAB hosts may be essentially based on: (i) the expression of native biosynthetic genes; (ii) the exchange of leader sequences and/or dedicated processing and secretion systems (ABC transporters), or (iii) the use of signal peptides that act as secretion signals recognized by the Sec-system (Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). Concerning the latter, the successful use of chimeras of heterologous signal peptides fused to mature bacteriocins to drive their secretion by *Lc. lactis* in the absence of specific immunity and secretion proteins has been previously reported (Worobo *et al.*, 1995; Nouaille *et al.*, 2003; Herranz and Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). Similarly, in this work, the replacement of the leader sequence of the class IIa bacteriocins CurG14 and CurG15 produced by *Lb. curvatus* BCS35 by the signal peptide of Usp45 (SP_{Usp45}), a Sec-dependent protein produced by *Lc. lactis*, and the transformation of *Lc. lactis* NZ9000 cells with plasmids derived from the expression vector pNZ8048 containing chimeras of the SP_{Usp45} fused to mature CurG14 (pNUG14E) and CurG15 (pNUG15E) under control of the P_{nisA} inducible promoter, have permitted the production of CurG14 and CurG15 in *Lc. lactis* NZ9000. In addition, the results of this work indicate that these chimeras drive a high production and secretion of these bacteriocins in *Lc. lactis* NZ9000,

even in the absence of specific immunity and dedicated secretion proteins. Therefore, *sppA* and *sakX* are the minimum requirement for production of biologically active CurG14 and CurG15, respectively, in *Lc. lactis* NZ9000, as demonstrated for other bacteriocins possessing a dedicated secretion and processing system that can nevertheless efficiently access the Sec-pathway when equipped with an appropriate signal peptide (McCormick *et al.*, 1996; Biet *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2005a, 2005b, 2006; Sánchez *et al.*, 2008; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b).

The generation of antibodies of predetermined specificity for CurG14 and CurG15 has allowed the detection and quantification of these bacteriocins in the supernatants from the recombinant *Lc. lactis* NZ9000 strains by an NCI-ELISA. The maximum amount of CurG14 (4.9 µg/ml) and CurG15 (17.2 µg/ml) produced by these recombinant strains represented approximately a 25- and a 4-fold increase compared with those quantified in the supernatants of *Lb. curvatus* BCS35 (0.2 and 4.4 µg/ml of CurG14 and CurG15, respectively), which is a promising result since, in spite of the use of different microbial hosts and expression systems, the heterologous expression of class II bacteriocins has resulted in most cases in lower amounts of bacteriocin than that obtained from the natural producers (Marugg *et al.*, 1992; Chikindas *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). Amongst the factors that influence bacteriocin production, expression vector size, stability, and copy number, as well as the promoter used to drive gene expression, seem to be relevant aspects (Borrero *et al.*, 2011b). Concerning the latter, inducible systems are often considered more efficient than constitutive expression systems since the former enable achievement of sufficient biomass prior to initiation of target protein expression (Kim and Mills, 2007; Borrero *et al.*, 2011b). Besides, the short induction time for optimal bacteriocin production using nisin-inducible systems most probably prevents bacteriocins from attaching to cell walls, forming aggregates, and/or undergoing protease degradation (Gutiérrez *et al.*, 2006). In this respect, the results obtained in this work show that induction at an OD₆₀₀ of 0.5 and further growth of the recombinant cells for 3 h are required for optimal heterologous production of CurG14 and CurG15. With regard to the antimicrobial activity of the heterologous peptides, it should be noted that it was in agreement with that expected from their production as determined by an NCI-ELISA. This, together with the fact that MALDI-TOF analysis of the purified peptides yielded fragments of the expected molecular mass, strongly demonstrates that both bacteriocins are adequately processed and secreted.

On the other hand, the combination of immunochemical and microbiological assays in this work has provided valuable information on the effect of temperature on the production of CurG14 and CurG15 by *Lb. curvatus* BCS35. Low bacteriocin activity was recorded when the strain was grown in GM17 broth, suggesting that specific nutrients present in MRS broth are required for bacteriocin production, similarly as previously described (Leroy and de Vuyst, 1999; Herranz, 2001; Todorov *et al.*, 2004). Production of CurG14 and CurG15 in MRS broth was observed from the beginning of the exponential phase of growth, and the highest bacteriocin concentrations were detected at the late logarithmic phase, as described for most bacteriocins (Parente and Hill, 1992; Franz *et al.*, 1996; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Diep and Nes, 2002; Herranz *et al.*, 2001; Criado, 2006; Criado *et al.*, 2006b), except at 37°C, where the maximum concentration was detected at the end of the stationary phase.

CurG14 and CurG15 were optimally produced at 30 and 18°C, respectively. Although the latter is not the optimal temperature for growth of the producer strain, maximal bacteriocin production under suboptimal growth temperatures has been previously described for curvacin A (Vogel *et al.*, 1993; Messesns *et al.*, 2003), sakacin K (Møretrø *et al.*, 2000), sakacin A (Diep *et al.*, 2000), SakP (Aasen *et al.*, 2000), lacticin RM, mesentericin 52A (Krier *et al.*, 1998), amoylovorin L471 (de Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998), and EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Criado *et al.*, 2006b). This phenomenon could be ascribed to one or more of the following reasons: (i) decreased degradation/inactivation of the bacteriocin; (ii) lower rate of enzymatic reactions resulting in reduced growth rate and a concomitant increase in the pools of metabolites essential for bacteriocin synthesis; (iii) decreased adsorption of the bacteriocin to the producer cells; (iv) higher gene expression, at the transcription and/or the translation level, and (v) in the case of those bacteriocins whose production is controlled by a three-component regulatory system, to a higher production of the inducing peptide (Leroy and de Vuyst, 1999; Aasen *et al.*, 2000; Diep *et al.*, 2000; Møretrø *et al.*, 2000; Keren *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b). Besides, it should be noted that the considerable influence of growth temperature on bacteriocin production observed in this work does not seem to correlate with its moderate effect on the achieved biomass. In this context, the amount of bacteriocins produced by cells that had reached, for example, an OD₆₀₀ of approximately 0.7, was much lower at 8 and 4°C than at 37, 30, 25 and 18°C. Therefore, temperature may exert an influence on CurG14 and CurG15 production by *Lb. curvatus* BCS35 not directly related to growth, as previously suggested (Lejeune *et al.*, 1998; Parente and Ricciardi, 1999; Leroy and de Vuyst, 2002).

Concerning the relationship between bacteriocin concentration and antimicrobial activity, it should be mentioned that the highest antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35 at 18°C could be attributed to the higher production of CurG15 at this temperature. However, the relatively high antimicrobial activity detected at 8°C does not seem to be related to the small amount of CurG14 or CurG15 detected at this temperature (Table VI.6), but might be due to the production of other bacteriocins, like sakacin Q (SakQ) and/or sakacin T (SakT), whose structural genes are also present in the nucleotide sequence of *Lb. curvatus* BCS35 (Chapter IV). On the other hand, the maximum antimicrobial activity detected after 33 h of growth at 37°C is not in concordance with the maximum production of CurG14 and CurG15 detected at the final stage of the stationary phase (at a growth time of 60 and 55 h, respectively).

On the other hand, the fact that the bacteriocins encoded by a multibacteriocinogenic strain are optimally produced at different temperatures has been previously reported for other LAB, such as *Le. mesenteroides* FR52, which produces mesentericin 52A and mesentericin 52B maximally at 20 and 25°C, respectively (Krier *et al.*, 1998), and *E. faecium* L50, which optimally produces EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP, and EntQ at 25, 37 and 47°C, respectively (Criado *et al.*, 2006b). Considering that temperature may favor production of a desired bacteriocin, it could be feasible to manipulate the ratio of production of different bacteriocins by a multiple bacteriocin producer by controlling the incubation temperature (Parente and Ricciardi, 1999), which might constitute an important factor in the event of a

synergistic effect between bacteriocins, where an optimal ratio would permit an increase of the total antimicrobial activity (Krier *et al.*, 1998).

The use of specific anti-CurG14 and anti-CurG15 antibodies developed in this work has also shown that the maximum amount of CurG14 (0.2 µg/ml) and CurG15 (4.4 µg/ml) produced by *Lb. curvatus* BCS35 are rather different. The low level of production of CurG14 by this multiple bacteriocin producer strain is comparable to those of EntL50 (EntL50A [0.2 µg/ml] and EntL50B [0.2 µg/ml]) produced by *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b). However, the amount of CurG15 is quite similar to the values previously reported for production of other LAB bacteriocins such as enterocin A (2.5 µg/ml) by *E. faecium* T136 (Martínez *et al.*, 2000), pediocin PA-1 (1.9 µg/ml) by *Pediococcus acidilactici* 347 (Martínez *et al.*, 1999), SakP (0.5-1 µg/ml) by *Lb. sakei* CCUG 42687 (Aasen *et al.*, 2000), and EntQ (3.7 µg/ml) and EntP (8.1 µg/ml) by *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b). On the other hand, several reports have shown that identical bacteriocins may be produced in different amounts by different genera, species, and even strains (Yang and Ray, 1994; Horn *et al.*, 1998, 1999; Martínez *et al.*, 1999; Parente and Ricciardi, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b). These differences may be explained by: (i) the copy number and transcription/translation levels of the bacteriocin structural genes; (ii) the specific activity of maturing enzymes, when required, and (iii) the level of bacteriocin resistance/immunity of the producer cells (Horn *et al.*, 1998, 1999; Parente and Ricciardi, 1999; Abriouel *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2004).

Summarizing, the present work describes the suitability of the immunochemical strategy based on the use of bacteriocin-specific polyclonal antibodies for the characterization of bacteriocin production by both the wild-type multibacteriocinogenic strain *Lb. curvatus* BCS35 and the recombinant host *Lc. lactis* NZ9000 strains. Our results show a high level production of active bacteriocins CurG14 and CurG15 by the heterologous LAB host using genetic chimeras encoding the heterologous SP fused to the mature bacteriocin, which allowed to increase the production of these bacteriocins 20- and 4-fold, respectively, compared to the results obtained for the wild-type strain. The development of systems for heterologous production of LAB bacteriocins may contribute to overcome the problems often encountered for their application in the veterinary, medical and food fields, such as high-costs, poor adaptability to the food environment, low yields and/or genetic instability. However, the use of genetically modified organisms in the food industry is still a contentious issue which requires further research efforts as well as consumer communication strategies for achieving a more widespread and accepted use of this promising strategy.

VI.6. REFERENCES

- Aasen, I. M., T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson, and I. Storrø. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 159–166.
- Abriouel, H., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, and A. Gálvez. 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods* 55: 599–605.

- Biet, F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatempo, and C. Fremaux.** 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology* 144: 2845–2854.
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731–753.
- Bolotin, A., S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2002. Studies of genomes of dairy bacteria *Lactococcus lactis*. *Sci. Aliment.* 22: 45–53.
- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiéz, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2011a. Use of the *usp45* lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 131–143.
- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiéz, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2011b. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156: 76–86.
- Bron, P. A., M. G. Benchimol, J. Lambert, E. Palumbo, M. Deghorain, J. Delcour, W. M. De Vos, M. Kleerebezem, and P. Hols.** 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5663–5670.
- Burgess, C., M. O’Connell-Motherway, W. Sybesma, J. Hugenholtz, and D. van Sinderen.** 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5769–5777.
- Chikindas, M. L., K. Venema, A. M. Ledeboer, G. Venema, and J. Kok.** 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 183–189.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 281–305.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1–20.

- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Criado, R.** 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Criado, R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- de Ruyter, P. G., O. P. Kuipers, and W. M de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662–3667.
- de la Fuente-Salcido, N. M., J. E. Barboza-Corona, A. N. Espino Monzón, R. D. Pacheco Cano, N. Balagurusamy, D. K. Bideshi, and R. Salcedo-Hernández.** 2012. Expanding the use of a fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ScientificWorldJournal* doi:10.1100/2012/503269.
- de Vuyst, L., R. Callewaert, and K. Crabbé.** 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142: 817–827.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Devereaux, J., P. Haeberli, and O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res.* 12: 387–395.
- Diep, D. B., L. Axelsson, C. Grefslí, and I. F. Nes.** 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146: 2155–2160.
- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen, and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Driessen, A. J. M. and N. Nouwen.** 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 643–667.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, October 2005.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.

- EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria, an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Franz, C. M., U. Schillinger, and W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 255–270.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers, and J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291–34298.
- Gálvez, A., R. L. López, H. Abriouel, E. Valdivia, and N. B. Omar.** 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 125–152.
- Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1–9.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2004. Performance and applications of polyclonal antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2005a. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 239–250.
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández, and C. B. Míguez.** 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 125–131.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok, and P. E. Hernández.** 2006. High-level heterologous production and functional expression of the Sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13, in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 41–51.
- Herranz, C.** 2001. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico: optimización de la producción molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Herranz, C., J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2001. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 378–383.
- Herranz, C. and A. J. M. Driessen.** 2005. Sec-mediated secretion of enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959–1963.
- Holo, H. and I. F. Nes.** 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119–3123.

- Holo, H., Ø. Nilssen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez, and H. M. Dodd.** 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 818–823.
- Horn, N., M. L. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez, and H. M. Dodd.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4443–4450.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
- Jana, S. and J. K. Deb.** 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 289–298.
- Keren, T., M. Yarmus, G. Halevy, and R. Shapira.** 2004. Immunodetection of the bacteriocin lacticin RM: analysis of the influence of temperature and Tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2098–2104.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and O. P. Kuipers.** 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4581–4584.
- Kim, J. H. and D. A. Mills.** 2007. Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid* 58: 275–283.
- Krier, F., A. M. Revol-Junelles, and P. Germain.** 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 359–363.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink, and W. M. de Vos.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299–27304.
- Kuipers, O. P., P. G. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15: 135–140.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1998. Quorum-sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Kuipers, A., J. Wirenga, R. Rink, L. d. Kluskens, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers, and G. N. Moll.** 2006. Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7626–7633.
- Kunji, E. R. S., D. J. Slotboom, and B. Poolman.** 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1610: 97–108.
- Lejeune, R., R. Callewaert, K. Crabbé, and L. de Vuyst.** 1998. Modeling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Bacteriol.* 84: 159–168.
- Leroy, F. and L. de Vuyst.** 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 974–981.
- Leroy, F. and L. de Vuyst.** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 155–164.

- Leung, P. P., M. Khadre, T. H. Shellhammer, and A. E. Yousef.** 2002. Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 199–204.
- Lohans, C. T. and J. C. Vederas.** 2012. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.* 2012: 386410.
- Maischberger, T., I. Mierau, C. K. Peterbauer, J. Hugenholtz, and D. Haltrich.** 2010. High-level expression of *Lactobacillus* beta-galactosidases in *Lactococcus lactis* using the food-grade, nisin-controlled expression system NICE. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2279–2287.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007a. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 667–675.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007b. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.* 70: 2792–2798.
- Martínez, J. M., M. I. Martínez, C. Herranz, A. Suárez, M. F. Fernández, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez, and P. E. Hernández.** 1999. Antibodies to a synthetic 1-9-N-terminal amino acid fragment of mature pediocin PA-1: sensitivity and specificity for pediocin PA-1 and cross-reactivity against Class IIa bacteriocins. *Microbiology* 145: 2777–2787.
- Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders, and P. E. Hernández.** 2000. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3543–3549.
- Marugg, J. D., C. F. González, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder, and P. A. Vandenbergh.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2360–2367.
- Mathiesen, G., K. Gene, L. Kroeckel, L. Axelsson, and V. G. H. Eijssink.** 2005. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translation coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3565–74.
- Mathiesen, G., A. Sveen, J. C. Piard, L. Axelsson, and V. G. H. Eijssink.** 2008. Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105: 215–226.
- McCormick, J. K., R. W. Worobo, and M. E. Stiles.** 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide- dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4095–4099.
- Messaoudi S., G. Kergourlay, M. Dalgalarrrondo, Y. Choiset, M. Ferchichi, H. Prévost, M. F. Pilet, J. M. Chobert, M. Manai, and X. Dousset.** 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* 32: 129–134.
- Messens, W., J. Verluyten, F. Leroy, and L. de Vuyst.** 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41–52.

- Mierau, I. and M. Kleerebezem.** 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 705–717.
- Mierau, I., P. Leji, I. van Swam, B. Blommestein, E. Floris, J. Mond, and E. J. Smid.** 2005a. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4: 15.
- Mierau, I., K. Olieman, J. Mond, and E. J. Smid.** 2005b. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb. Cell Fact.* 4: 16.
- Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault, and M. Lacroix.** 2008. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1997–2003.
- Morello, E., L. G. Bermúdez-Humarán, D. Llull, V. Solé, N. Miraglio, P. Langella, and I. Poquet.** 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 48–58.
- Møretrø, T., I. M. Aasen, I. Storrø, and L. Axelsson.** 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88: 536–545.
- Natale, P., T. Brüsser, and A. J. Driessen.** 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1735–1756.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F. and V. G. H. Eijsink.** 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: “*Cell-Cell Signaling in Bacteria*”, pp. 175–192. Dunny, G. M. and S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Nes, I. F. and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 55: 50–61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Nouaille, S., L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella y V. Azevedo.** 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 2: 102–111.
- Olempska-Beer, Z. S., R. I. Merker, M. D. Ditto, and M. J. Di Novi.** 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45: 144–158.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Parente, E. and C. Hill.** 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55: 497–502.
- Parente, E. and A. Ricciardi.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628–638.

- Platteeuw, C., I. van Alen-Boerrigter, S. van Schalkwijk, and W. M. de Vos. 1996. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1008–1013.
- Rigoulay, C., I. Poquet, S. M. Madsen, and A. Gruss. 2004. Expression of the *Staphylococcus aureus* surface proteins HtrA1 and HtrA2 in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 279–288.
- Rose, N. L., P. Sporns, and L. M. McMullen. 2001. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* 13: 225–239.
- Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernandez. 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227–236.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernandez. 2008. Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2471–2479.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
- Sit, C. S. and J. C. Vederas. 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.* 86: 116–123.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes. 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “Genetics of lactic acid bacteria”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Svetoch, E. A., V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko, B. V. Eruslanov, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. V. Perelygin, Y. G. Stepanshin y N. J. Stern. 2008. Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3863–3865.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel, and W. P. Hammes. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Todorov, S. D., C. A. van Reenen, and L. M. Dicks. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 149–157.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati, and G. Giraffa. 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.* 11: 243–252.
- van de Guchte, M., J. Kok, and G. Venema. 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 8: 73–92.
- van Asseldonk, M., G. Rutten, M. Oteman, R. J. Siezen, W. M. de Vos, and G. Simons. 1990. Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95:155–160.

- van Asseldonk, M., W. M. de Vos, and G. Simons.** 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* Usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α -amylase. *Mol. Gen. Genet.* 240: 428–434.
- Vogel, R. F., B. S. Pohle, P. S. Tichaczek, and W. P. Hammes.** 1993. The competitive advantage of *Lactobacillus curvatus* LTH1174 in sausage fermentations is caused by formation of curvacin A. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 457–462.
- Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. van Sinderen, and J. Kok.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189: 3256–3270.
- Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177: 3143–3149.
- Yang, R. and B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281–291.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN INTEGRADORA

En este trabajo de investigación se procedió al aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca) con el objetivo de disponer de cepas con actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, para evaluar la eficacia de su empleo en la bioconservación del pescado fresco. El interés de la evaluación del empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino y/o sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado se basa en su capacidad para controlar la presencia y el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos. A este respecto, conviene destacar que, de forma general, existen cuatro estrategias para emplear las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y sus bacteriocinas en la bioconservación de los alimentos: (i) empleo de cultivos que produzcan la(s) bacteriocina(s) *in situ* como cultivos protectores y/o iniciadores; (ii) empleo de medios fermentados por bacterias lácticas bacteriocinogénicas o por cepas recombinantes bacteriocinogénicas como ingredientes alimentarios; (iii) empleo de bacteriocinas y/o sus mezclas, parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad, como aditivos alimentarios, e (iv) incorporación o inmovilización de la(s) bacteriocina(s) en el material utilizado para el envasado de los alimentos con el fin de desarrollar envases activos. En este trabajo se propone una estrategia de bioconservación del pescado fresco que, además de contribuir a garantizar su calidad higiénico-sanitaria y seguridad, ayudaría a generar un mayor rendimiento económico de la actividad pesquera ya que los productos que lleguen al mercado en buenas condiciones de conservación alcanzarán, generalmente, precios más altos, tanto en el comercio mayorista como en el comercio minorista. Asimismo, mediante el empleo de esta estrategia de bioconservación se satisfacerían las demandas de los consumidores que, cada vez más, requieren alimentos más seguros, menos procesados y de mayor calidad higiénico-sanitaria y organoléptica. En este contexto, en este trabajo se han utilizado diversas técnicas microbiológicas, bioquímicas, genéticas, inmunoquímicas y tecnológicas para la consecución de los siguientes objetivos:

1. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca) con actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos del pescado y los productos de la pesca.
2. Evaluación del potencial biotecnológico y de la seguridad *in vitro* de la cepa multibacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado y con un amplio espectro de acción antimicrobiano. Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas.
3. Desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus boscii*), a escala de laboratorio y semiindustrial, utilizando las cepas multibacteriocinogénicas de origen marino *Lb. curvatus* BCS35 y *Enterococcus faecium* BNM58.
4. Producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 y detección y cuantificación de su producción por la cepa salvaje *Lb. curvatus* BCS35 y las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas.

VII.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO

VII.1.1. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DEL PESCADO, MARISCO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

El pescado como materia prima es un grupo difícil de definir ya que incluye una gran variedad de especies que se pueden obtener a partir de diversos entornos (agua dulce o salada, aguas tropicales y aguas árticas) y que pueden provenir de distintos hábitats (pelágicos, bentónicos, de fondo, etc.) y/o tipos de actividades pesqueras (pesca extractiva o acuicultura) (Gram y Huss, 1996). En este trabajo, las muestras empleadas para el aislamiento de bacterias lácticas bacteriocinogénicas se seleccionaron con el objeto de abarcar el mayor número de especies marinas de interés comercial, así como productos pesqueros listos para el consumo, obtenidas en distintos puntos de venta (mercados de pescado o lonjas y supermercados), y de las que se emplearon, a su vez, diversas partes anatómicas (principalmente piel, músculo y vísceras) (Tabla III.2). El aislamiento de la microbiota de las muestras se realizó en los siguientes medios: (i) PCA (*Plate Count Agar*), medio general para recuento de microorganismos; (ii) MRS (*de Man, Rogosa y Sharpe*), medio selectivo para el aislamiento de bacterias lácticas, y (iii) KAA (*Kanamicina, Azida y Aesculina*), medio selectivo para el aislamiento de *Enterococcus* spp. Finalizada la incubación de las placas a 25°C en condiciones de microaerofilia durante 2–5 días, se cuantificó la microbiota total, la microbiota láctica y la microbiota enterococal de cada una de las muestras, lo que puso de manifiesto una gran heterogeneidad dependiendo del tipo de muestra analizada (Tabla III.4).

Para la mayoría de las muestras, los recuentos de microbiota total en PCA oscilaron entre $1,5 \times 10^2$ y 8×10^3 ufc/g, si bien, en el caso del pulpo, calamar y sardina estos valores se incrementaron hasta $8,5 \times 10^4$, $1,8 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^5$ ufc/g, respectivamente (Tabla III.4). Al comparar los recuentos obtenidos según el punto de venta, se puede observar que la población bacteriana total de las muestras obtenidas en los supermercados osciló en un intervalo de valores con mayores recuentos de población (entre $8,5 \times 10^4$ cfu/g [pulpo] y $3,2 \times 10^7$ cfu/g [salmón marinado]) que el de las muestras obtenidas en las lonjas (entre $4,0 \times 10^2$ cfu/cm² [trucha arcoíris] y $9,6 \times 10^6$ cfu/cm² [gallo]). Por otra parte, entre los productos listos para el consumo, el salmón ahumado mostró el recuento más bajo ($2,4 \times 10^3$ cfu/g) y el salmón marinado el más alto ($3,2 \times 10^7$ cfu/g), lo que representa un incremento de cuatro órdenes de magnitud con respecto al obtenido en el salmón ahumado, siendo el valor del salmón marinado el más alto de los recuentos totales de todas las muestras (Tabla III.4). A este respecto, conviene destacar que la variedad de métodos de recuento microbiológico empleados para el aislamiento de microorganismos, entre los que se incluyen métodos cultivo-dependientes e -independientes, ha resultado en un gran número de trabajos sobre la cuantificación de las poblaciones microbianas en el pescado y los productos de la pesca, dando como resultado un rango muy amplio y diverso de microorganismos aislados de origen marino y haciendo dificultosa la comparación entre los recuentos obtenidos en los distintos estudios (Shewan, 1962; Liston, 1980; Gram y Huss, 1996; Fraser y Sumer, 1998a; Austin, 2002; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2005).

Con respecto a la microbiota láctica (Tabla III.4), ésta representó un porcentaje muy elevado, 62,5–89,1%, de la microbiota total de la mitad de las muestras de moluscos (mejillón [69,7%] y pulpo [75,1%]) (Fig. 7.1) y de una de las muestras de acuicultura (piel [75,0%] y vísceras [62,5%] de trucha arcoíris) (Fig. 7.2); 22,5 y 20,4% de las muestras de berberecho (Fig. 7.1) y piel de lubina (Fig. 7.2), respectivamente; y un bajo porcentaje, 0–8,7%, de la microbiota total de las muestras de crustáceos (nécora [1,3%], y músculo [2,9%] y vísceras [0,5%] de cigala) (Fig. 7.3), de todas las muestras de peces de agua salada y pesca extractiva (hígado [0,3%] y vísceras [0,0%] de maruca; piel [0,4%], músculo [0,4%] y vísceras [2,4%] de sardina; piel [8,4%] y músculo [7,9%] de bonito; y piel [1,8%], músculo [1,0%] y huevos [2,3%] de gallo) (Fig. 7.4), de una sola muestra de moluscos (calamar [0,7%]) (Fig. 7.1) y de una muestra de acuicultura (músculo [5,7%] y vísceras [8,7%] de lubina) (Fig. 7.2).

En lo que respecta a la microbiota enterococal (Tabla III.4), una menos de la mitad de las muestras analizadas presentaron poblaciones significativas. En este contexto, los enterococos representaron un 25–100% de la microbiota láctica de todas las muestras de moluscos (calamar [54,6%], pulpo [32,8%], mejillón [51,9%] y berberecho [42,4%]) (Fig. 7.1) y crustáceos (nécora [25%] y músculo [27,5%] y vísceras [89,4%] de cigala) (Fig. 7.3), de una de las muestras de acuicultura (piel [33,3%] de trucha arcoíris) (Fig. 7.2) y de una de las muestras de peces de agua salada y pesca extractiva (hígado de maruca [100%]) (Fig. 7.4). Por el contrario, la microbiota enterococal representó un bajo porcentaje, 0–6,3%, de la mayoría de las muestras de peces de agua salada y pesca extractiva (piel [2,6%], músculo [6,3%] y vísceras [1,8%] de sardina; piel [1,1%] y músculo [0,1%] de bonito; piel [0,4%], músculo [0,4%] y huevos [0,1%] de gallo; y vísceras de maruca [0%]) (Fig. 7.4), y de casi todas las muestras de acuicultura (piel [2,1%], músculo [4,6%] y vísceras [0%] de lubina; vísceras de trucha arcoíris [0%]; y salmón fresco [0,6%]) (Fig. 7.3).

El primer estudio en el que se describe que el pescado puede contener bacterias lácticas fue publicado por Dyer (1947), en el que se demuestra la presencia de *Lactobacillus* spp. en la piel, agallas e intestino de bacalao Atlántico (*Gadus morhua* L.). Más tarde, Kraus (1961) describió el aislamiento de cepas del género *Lactobacillus* de arenque fresco (*Clupea harengus*) y Kvasnikov *et al.* (1977) describió la presencia de bacterias lácticas en el intestino de varias especies de peces de estanque en etapa larvaria y de alevinaje, y proporcionó información sobre los cambios de su composición en función de la estación del año y la etapa de vida de los peces. Más recientemente, se han publicado diversos estudios que ponen de manifiesto la presencia de *Carnobacterium* spp. en el tracto digestivo de distintos tipos de pescados como la lubina estriada (*Morone saxatilis*), el salmón Atlántico (*Salmo salar*), el lucio (*Esox lucius*) y la trucha común (*Salmo trutta*) (Baya *et al.*, 1991; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Ringø, 2008). Por otra parte, Ringø y Holzapfel (2000) aislaron la microbiota de agallas de salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) y encontraron un 26% de *Carnobacterium* spp., sugiriendo que este género puede formar parte de la microbiota normal del ambiente marino. Por su parte, González *et al.* (2000) encontraron que la microbiota de las agallas y la piel de la trucha común estaba dominada por *Carnobacterium* spp. (44–50%), género que también encontraron en las agallas de lucio (20%) junto con *Lactococcus* spp. (10%). Sin embargo, en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de acuicultura,

González *et al.* (1999) aislaron *Enterococcus* spp. de la piel (10%) y *Lactobacillus* spp. de las agallas (11%), además de aislar *Carnobacterium* spp. (14%) del agua. A pesar de que, en general, la información sobre la presencia e incidencia de bacterias lácticas en las diferentes partes anatómicas de los peces, como piel, agallas o vísceras, es limitada, los resultados de nuestro trabajo están en concordancia con los citados anteriormente ya que se aisló microbiota láctica de todas las muestras de pescado fresco, excepto de las vísceras de maruca (Tabla III.4).

Por otra parte, de las muestras de pescado listas para el consumo analizadas en este trabajo, el salmón ahumado y el salmón marinado presentaron los porcentajes más elevados de bacterias lácticas (salmón ahumado [89,1%] y salmón marinado [80,7%]); sin embargo, el bacalao salado presentó un valor relativamente bajo (6,3%) (Tabla III. 4 y Fig. 7.5). En general, los productos listos para el consumo tienen su propia microbiota, la cual está principalmente determinada por las condiciones de conservación utilizadas. A este respecto, el efecto del cloruro sódico (NaCl) en la conservación de los alimentos es debido principalmente a la reducción de la actividad de agua (a_w), lo que dificulta la proliferación microbiana (secciones II.1.6.3 y II.1.6.4). Durante el proceso de salado, la composición química y el peso del pescado experimentan cambios considerables, originados principalmente por el incremento de los niveles de NaCl en el músculo y por la reducción del contenido de agua, alcanzando tras el salado un 18–22% de sal y un 50–57% de agua (sección II.1.6.3) (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005); sin embargo, se ha descrito previamente la capacidad de algunas bacterias lácticas para desarrollarse en presencia de concentraciones de NaCl relativamente elevadas (Korkeala *et al.*, 1992; Lyhs, 2002). En el proceso de ahumado en frío del pescado se alcanzan temperaturas no superiores a 28°C, con concentraciones de NaCl del 2–3% (sección II.1.6.4), y, normalmente, el producto resultante es envasado al vacío. Este proceso no elimina la microbiota natural presente en el pescado, ni los patógenos psicrotrofos, y por este motivo el producto final debe mantenerse siempre a temperaturas de refrigeración (Lyhs, 2002). Bajo estas condiciones, después de 1–2 semanas de almacenamiento a 5°C, la microbiota termina siendo dominada por bacterias lácticas (Leisner *et al.*, 1994; Truelstrup Hansen *et al.*, 1995; Østergaard *et al.*, 1998; Gram y Dalgaard, 2002). Por otra parte, el marinado es un proceso mediante el cual la carne del pescado se sumerge en una solución ácida que contiene ácido acético, sales y, en algunas ocasiones, especias (sección II.1.6.5). En los pescados tratados de esta forma, el propio proceso de marinado inhibe las bacterias alterantes Gram-negativas, pero no las bacterias lácticas, las cuales pueden deteriorar el producto si éste no es manipulado y almacenado correctamente (Lyhs, 2002). En nuestro trabajo, las bacterias lácticas fueron la población bacteriana dominante tanto en el salmón ahumado como en el salmón marinado, de forma similar a lo descrito previamente por Gram y Dalgaard (2002).

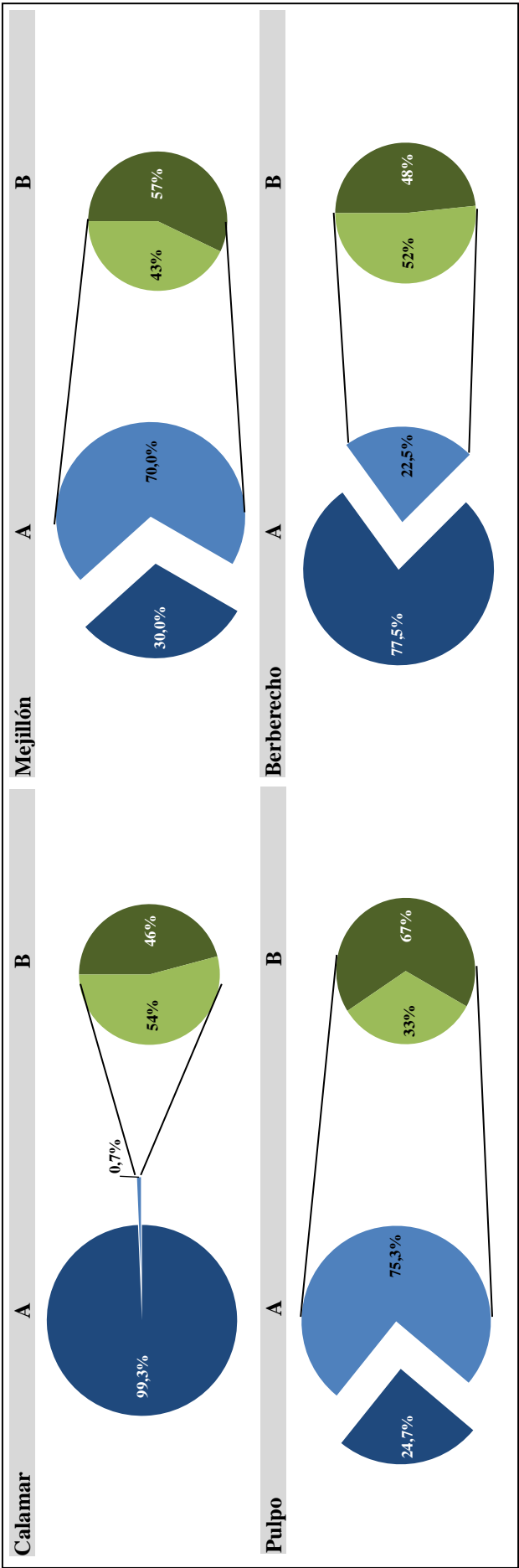


Figura 7.1. Composición microbiana de las muestras de moluscos. Porcentajes de población microbiana (% de población microbiana diferente a las bacterias lácticas [●] y % de bacterias lácticas [●]) (A), y porcentajes de bacterias lácticas (% de bacterias lácticas no enterococales [●] y % de enterococos [●]) (B), de las muestras de calamar, pulpo, berberecho y mejillón, determinados mediante recuentos en PCA, MRS y KAA.

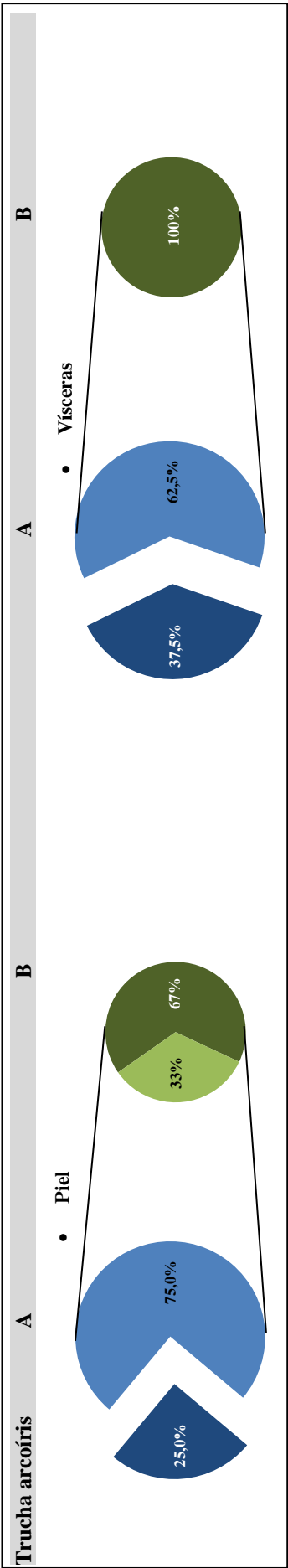


Figura 7.2. Composición microbiana de las muestras de pescados de acuicultura. Porcentajes de población microbiana (% de población microbiana diferente a las bacterias lácticas [●] y % de bacterias lácticas [●]) (A), y porcentajes de bacterias lácticas (% de bacterias lácticas no enterococales [●] y % de enterococos [●]) (B), de las muestras de trucha arcoíris, lubina y salmón fresco determinados mediante recuentos en PCA, MRS y KAA.

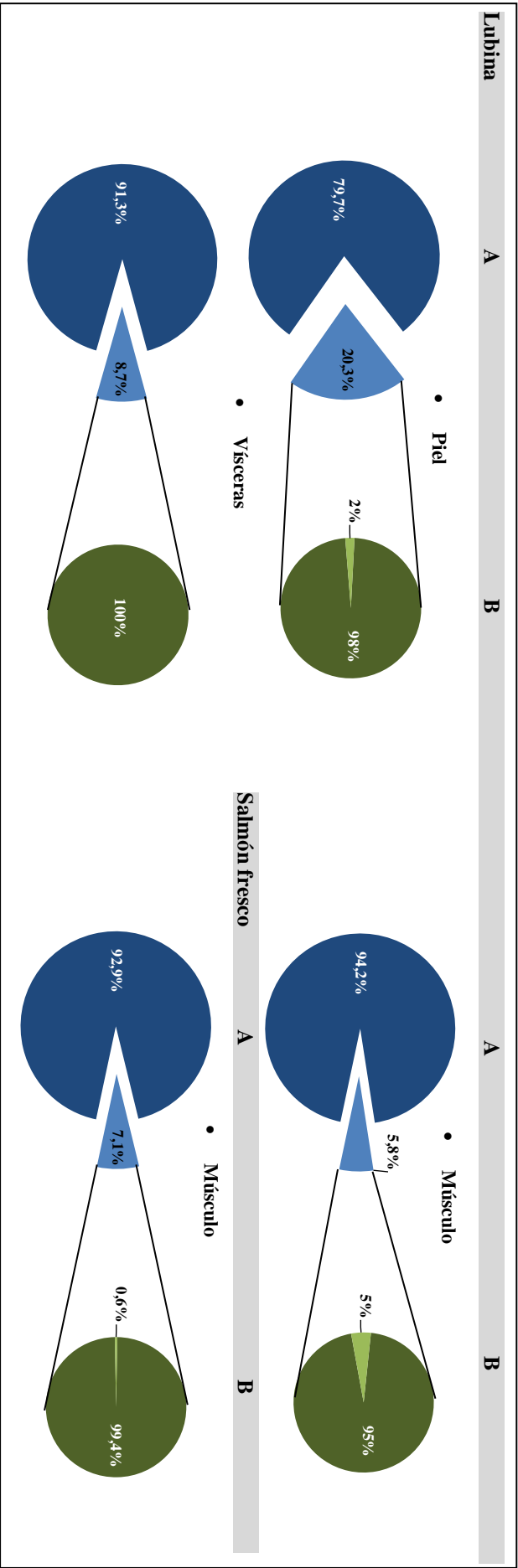


Figura 7.2. Continuación.

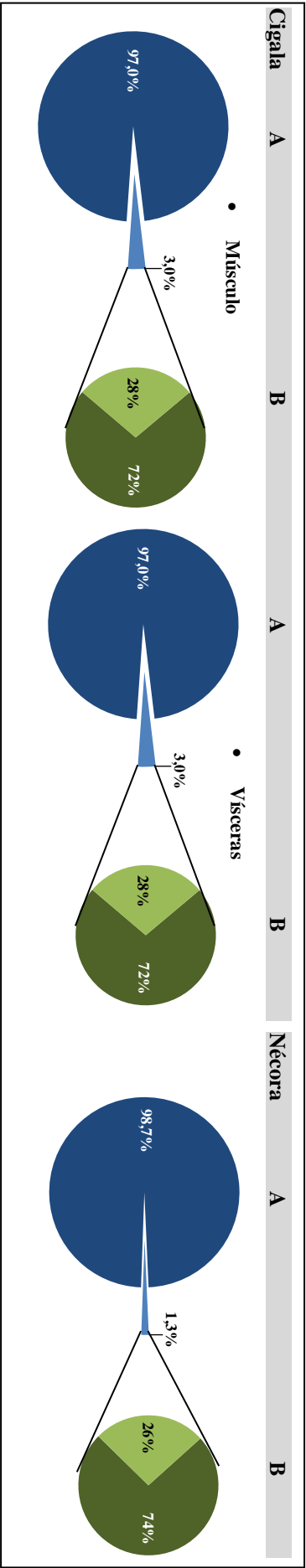


Figura 7.3. Composición microbiana de las muestras de crustáceos. Porcentajes de población microbiana (% de población microbiana diferente a las bacterias lácticas [●] (A), y porcentajes de bacterias lácticas (% de bacterias lácticas no enterococales [●] (B) y % de enterococos [●] (B), de las muestras de cigala y nécora determinados mediante recuentos en PCA, MRS y KAA.

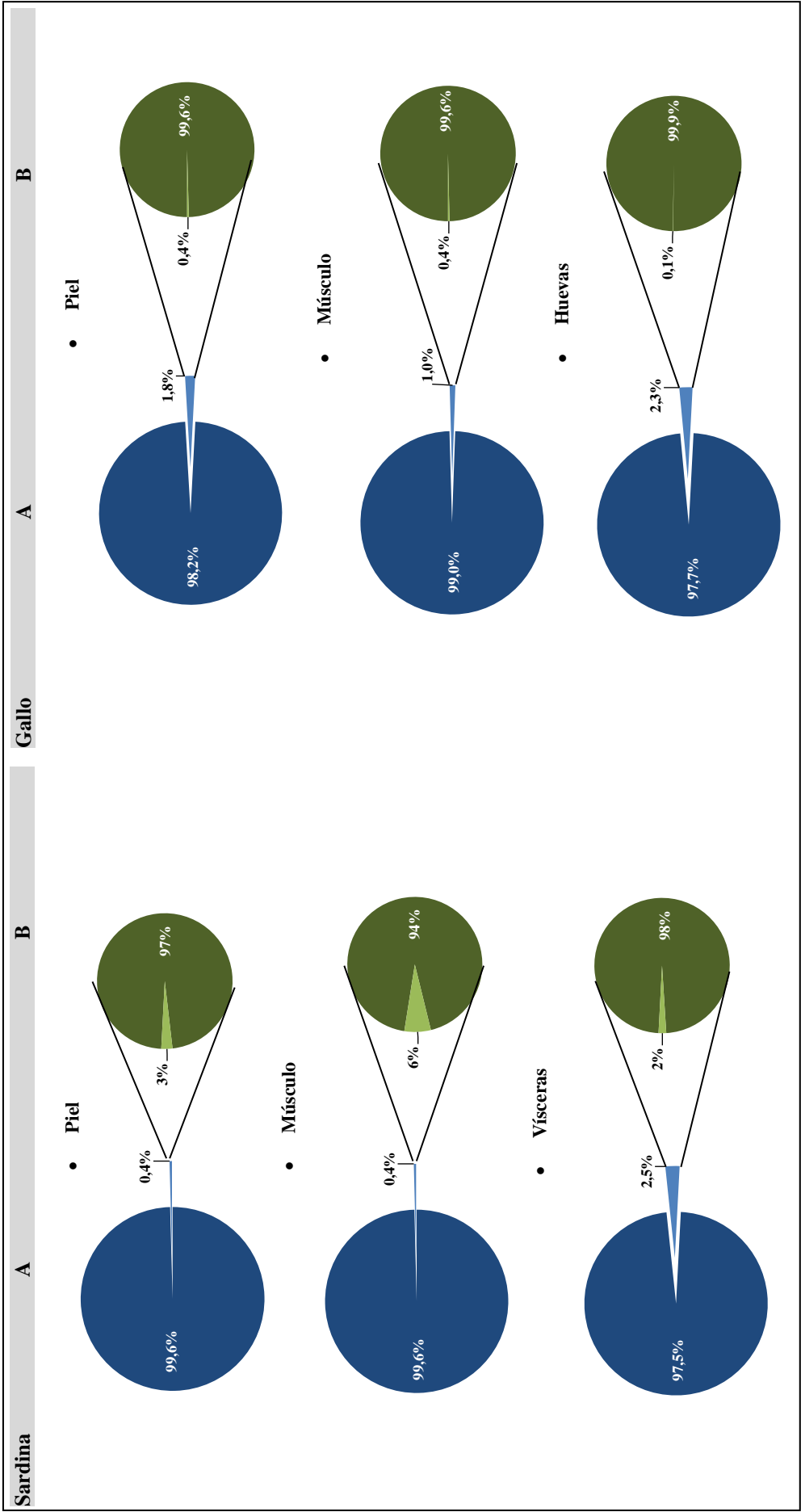


Figura 7.4. Composición microbiana de las muestras de pescados de agua salada y pesca extractiva. Porcentajes de población microbiana (% de población microbiana diferente a las bacterias lácticas [■] y % de bacterias lácticas [■]) (A), y porcentajes de bacterias lácticas no enterococales [■] y % de enterococos [■]) (B), de las muestras de sardina, gallo, bonito y maruca determinados mediante recuentos en PCA, MRS y KAA.

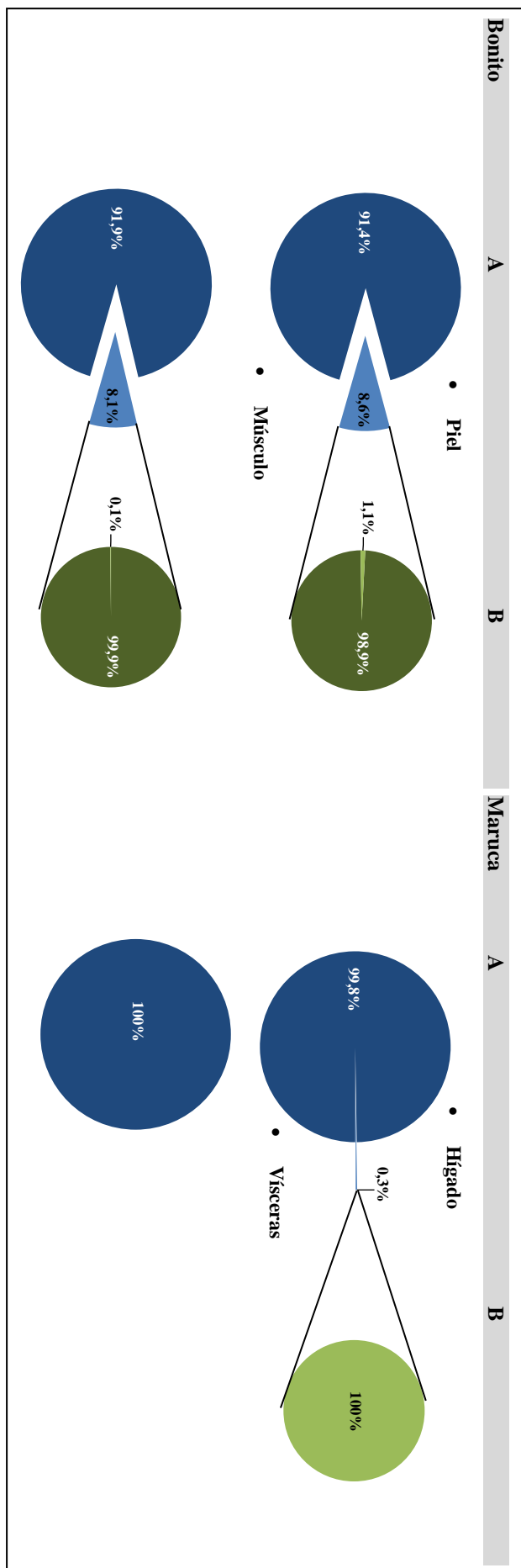


Figura 7.4. Continuación.

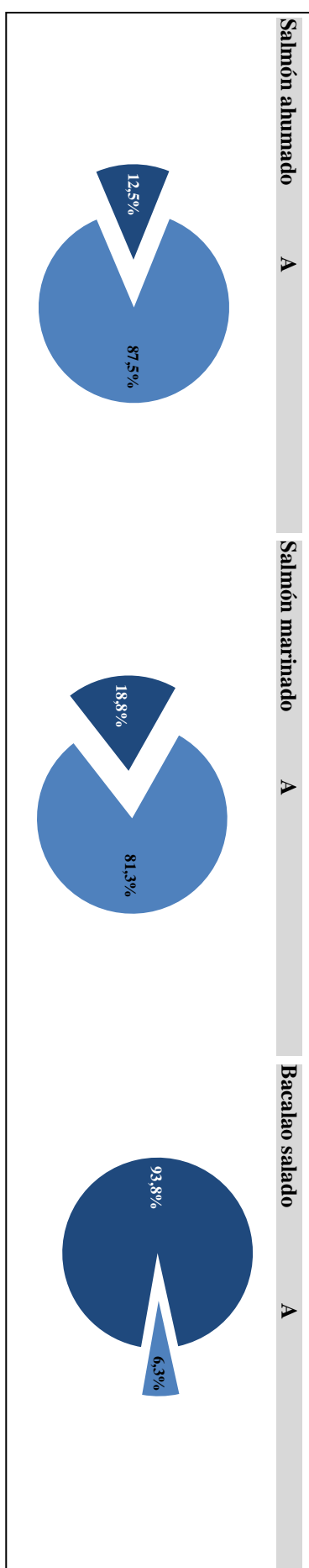


Figura 7.5. Composición microbiana de las muestras de productos de la pesca listos para el consumo. Porcentajes de población microbiana (% de población microbiana diferente a las bacterias lácticas [●] y % de bacterias lácticas [●]) (A) de las muestras de salmón ahumado, salmón marinado y bacalao salado determinados mediante recuentos en PCA y MRS.

VII.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN MARINO

El aislamiento y la caracterización de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de pescado y productos de la pesca ha sido descrito con anterioridad, aunque generalmente los estudios han estado enfocados principalmente a pescados de agua dulce (Ringø y Gateoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; González *et al.*, 1999, 2000; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Hagi *et al.*, 2004; Bucio *et al.*, 2006) o pescado fermentado (Cai *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2005). Conviene destacar que aunque los peces de agua salada también contienen bacterias lácticas, los estudios sobre el aislamiento y la caracterización de cepas con actividad antimicrobiana son muy escasos (Seppola *et al.*, 2006; Desriac *et al.*, 2010). Con el objeto de identificar entre las bacterias lácticas aisladas de cada sustrato aquéllas con actividad antimicrobiana, en este trabajo se seleccionaron un total de 1.245 cepas (40–100 de cada sustrato y con representantes de todos los grupos morfológicos presentes) de las placas de MRS y KAA. Posteriormente, se evaluó su actividad antimicrobiana directa mediante la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP) (Cintas *et al.*, 1995) frente a 20 microorganismos indicadores (Tabla III.1), entre los que se incluyen diversas bacterias lácticas bacteriocinogénicas, así como las cepas patógenas *L. monocytogenes* CECT4032 (serotipo 4b), *L. monocytogenes* CECT935 (serotipo 4b) y *L. monocytogenes* CECT936 (serotipo 1/2b) y diversos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos alterantes del pescado fresco (*Pseudomonas fluorescens* y *Shewanella putrefaciens*) y del pescado envasado al vacío (*Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus alimentarius*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens* y *Brochothrix thermosphacta*). La actividad antimicrobiana directa de las 1.245 bacterias lácticas seleccionadas se cuantificó determinando el diámetro de los halos de inhibición producidos, considerándose significativos únicamente aquéllos con un diámetro igual o superior a 3 mm (Tabla III.5 y Fig. 3.1, A). Nuestros resultados revelaron que un 15,8% de los aislados (197 cepas) mostraban actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, uno de los microorganismos indicadores utilizados, siendo destacable que ninguno de los aislados de mejillón, maruca, nécora, gallo, vísceras de trucha arcoíris y piel de bonito presentaron actividad antimicrobiana (Tablas III.5 y III.6). Conviene mencionar que los productos listos para el consumo (salmón ahumado, salmón marinado y bacalao salado), principalmente el salmón ahumado, fueron las muestras con los mayores porcentajes de aislados con actividad antimicrobiana directa (72,5, 35 y 50%, respectivamente) (Tablas III.5 y III.6). Con respecto a la actividad anti-*Listeria* directa de las bacterias lácticas aisladas en este trabajo, las muestras con los mayores porcentajes de cepas se obtuvieron para el bacalao salado (49%), salmón ahumado (40%), salmón fresco (28%) y berberecho (25%) (Tablas III.5 y III.6). En total, de los 197 aislados con actividad antimicrobiana directa, el 80,2% (158 cepas) presentaron actividad anti-*Listeria* directa (Tablas III.5 y III.6). En lo que respecta a la inhibición de los microorganismos Gram-negativos (*Ps. fluorescens* y *Shewanella* spp.) el 77,7% de los aislados (153 cepas) mostraron actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, uno de estos microorganismos (Tabla III.5). La inhibición de bacterias Gram-negativas por bacterias lácticas ha sido descrita con anterioridad y algunos estudios han demostrado que cepas no bacteriocinogénicas ejercen actividad antimicrobiana ácido-independiente (Leroi *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 1999, 2005). Asimismo, en los últimos años se han descrito varias bacteriocinas con actividad

antimicrobiana frente a microorganismos Gram-negativos como *Campylobacter* spp. o *Salmonella* spp. (Line *et al.*, 2008; Svetoch *et al.*, 2008a, 2011; Messaoudi *et al.*, 2012; de la Fuente-Salcido *et al.*, 2012).

Del análisis del espectro de actividad antimicrobiana de las 197 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa se deduce que muchas de ellas muestran una gran similitud, reflejo posiblemente de la producción de la(s) misma(s) sustancia(s) antimicrobiana(s), por lo que se seleccionaron para posteriores estudios un total de 64 cepas, entre las que se incluyeron representantes de todos los grupos de actividad antimicrobiana identificados.

VII.1.3. IDENTIFICACIÓN Y FILIACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ORIGEN MARINO

Para la identificación de las 64 cepas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas para determinar su capacidad de producir bacteriocinas, éstas se sometieron a diversas pruebas bioquímicas, así como a pruebas específicas para microorganismos del género *Enterococcus*. De forma general, los resultados mostraron que las 64 cepas son microorganismos Gram-positivos, catalasa negativos, cocos o bacilos anaerobios facultativos, con un pH final de los cultivos en caldo MRS de aproximadamente 4,6, y, por lo tanto, pertenecientes presumiblemente al grupo de las bacterias lácticas. Mediante las pruebas bioquímicas específicas para *Enterococcus* spp., se determinó que este género es el predominante en los aislados de medio marino. Posteriormente, la asignación de las bacterias lácticas aisladas al género *Enterococcus*, así como la identificación de las cepas como *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis*, se llevó a cabo mediante PCR empleando cebadores género- y especie-específicos, respectivamente (Tabla III.3). Las cepas no-enterococales, y algunos enterococos dudosos, se identificaron mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación nucleotídica del gen que codifica el ARNr 16S (*ADNr 16S*) y/o el gen de la superóxido dismutasa (*sodA*) (Kullen *et al.*, 2000; Poyart *et al.*, 2000), y, cuando fue necesario, mediante la determinación y el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales mediante SDS-PAGE (Tabla III.9) (Fig. 7.6). Los resultados confirmaron lo que se determinó previamente mediante pruebas bioquímicas; es decir, que la mayoría de las cepas (71,9%) pertenecen al género *Enterococcus* (Fig. 7.6). Por otra parte, las cepas no enterococales se identificaron como *Pediococcus* spp. (10,9%), *Weissella* spp. (7,8%), *Lactobacillus* spp. (7,8%) y *Leuconostoc* spp. (1,6%) (Fig. 7.6).

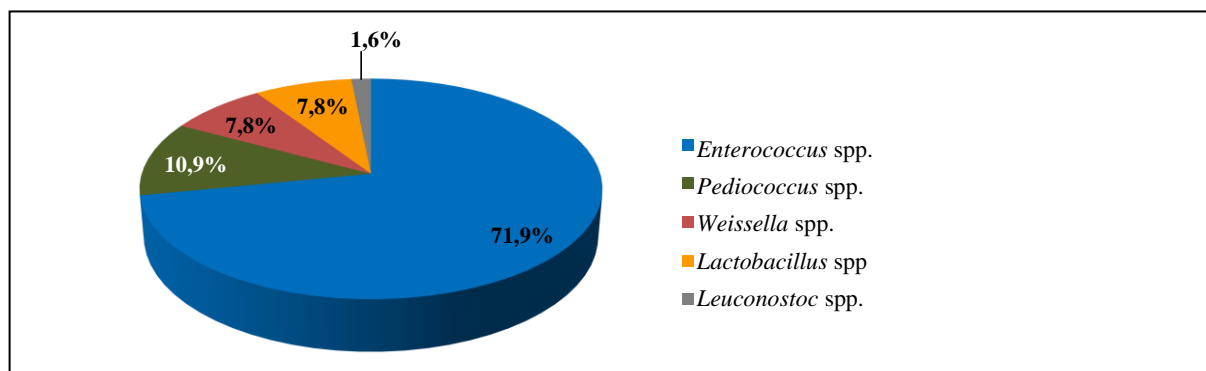


Figura 7.6. Géneros de bacterias lácticas (%) identificados entre las 64 cepas con actividad antimicrobiana de origen marino.

Los estudios sobre el aislamiento de bacterias lácticas de pescado, productos de la pesca y/o ambiente marino han descrito una diversidad considerable de géneros, de los que el género *Carnobacterium* se ha identificado generalmente como el mayoritario (Alves *et al.*, 2005; Bucio *et al.*, 2006; González *et al.*, 1999, 2000; Pinto *et al.*, 2009; Ringø *et al.*, 2000, 2001; Seppola *et al.*, 2006; Lauzon y Ringø, 2012); sin embargo, en el presente trabajo, los resultados obtenidos mostraron que el género *Enterococcus* es el predominante (71,9%, 46 cepas) de las bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana, y además, los enterococos se aislaron de todas las muestras excepto el salmón marinado (Tabla III.9). De forma similar, Petersen y Dalsgaard (2003) detectaron una alta prevalencia de cepas de *E. faecium* en muestras de intestino de pescado de acuicultura tradicional, sugiriendo que los enterococos pueden formar parte de la microbiota intestinal normal de los peces. Asimismo, Michel *et al.* (2007) analizaron una colección de cepas bacterianas asociadas a ambientes de pesca mediante análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA) para conocer la prevalencia de bacterias lácticas, y encontraron 12 *clusters*, dos de los cuales incluían enterococos que no pudieron ser caracterizados a nivel de especie mediante esta técnica. Además, encontraron cepas del grupo *E. faecium* y las especies *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*, que sólo pudieron ser caracterizadas mediante la secuenciación del gen *sodA*. Por otra parte, Valenzuela *et al.* (2010) aislaron e identificaron 24 cepas de *E. faecium* de una variedad de muestras de productos de la pesca, sobre todo filetes de pescado, sugiriendo que los enterococos pueden llegar a los productos de la pesca desde el intestino, durante la evisceración, o debido a la contaminación cruzada durante su manipulación y procesado. En el presente trabajo, los *Enterococcus* spp. aislados fueron identificados como *E. faecium* (52,2%) y *E. faecalis* (47,8%), lo que supone un 37,5 y 34,4%, respectivamente, de las 64 cepas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas (Fig. 7.7).

En lo que respecta a las 18 cepas no enterococales, que representaron un 28,1% de las 64 cepas con actividad antimicrobiana directa, ninguna fue identificada como *Carnobacterium* spp., y, sin embargo, el género *Pediococcus* fue el más abundante (Tabla III.9) (Fig. 7.6). Todas las cepas pertenecientes a este género se clasificaron como *Pediococcus pentosaceus*, lo que supone un 10,9% de las 64 cepas con actividad antimicrobiana directa (Fig. 7.7), y, sorprendentemente, la mayoría de ellas (71,4%) se aislaron de lubina (Tabla III.9). De forma similar, Pinto *et al.* (2009) identificaron una sola cepa bacteriocinogénica de *P. pentosaceus* de una colección de 78 cepas de bacterias lácticas aisladas de marisco. No obstante, Kopermsub y Yunchalard (2010) aislaron 762 bacterias lácticas de un producto de pescado fermentado típico de Tailandia y encontraron una alta prevalencia de *P. pentosaceus*, así como de *Weissella cibaria*, en diferentes etapas del proceso fermentativo. A este respecto, en nuestro trabajo, *W. cibaria* representó un 7,8% de las 64 bacterias lácticas seleccionadas (Tabla III.9) (Fig. 7.7), siendo destacable que todas las cepas se aislaron de pulpo. Por otra parte, *Lactobacillus* spp. se han aislado de numerosas especies y tipos de pescado (sección II.4.2.1.4) (Tabla II.21), y en nuestro estudio las cepas pertenecientes a este género representaron un 7,8% de las 64 cepas seleccionadas (Fig. 7.6). Conviene destacar que, a pesar de que se aislaron de diferentes muestras, al igual que en estudios anteriores, la mayoría (60%) de los lactobacilos fueron aislados de productos listos para el consumo (Tomé *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2011a). Por otra parte, el género *Leuconostoc* se ha relacionado también con el

pescado y los productos de la pesca, concretamente se ha aislado de marisco (Mauguin y Nobel, 1994) y anchoíta fresca (Belfiore *et al.*, 2010) cepas de *Le. mesenteroides*. En el presente trabajo, sólo una de las 64 bacterias lácticas seleccionadas pertenece a este género y se identificó como *Le. mesenteroides* (1,6%) (Fig. 7.7).

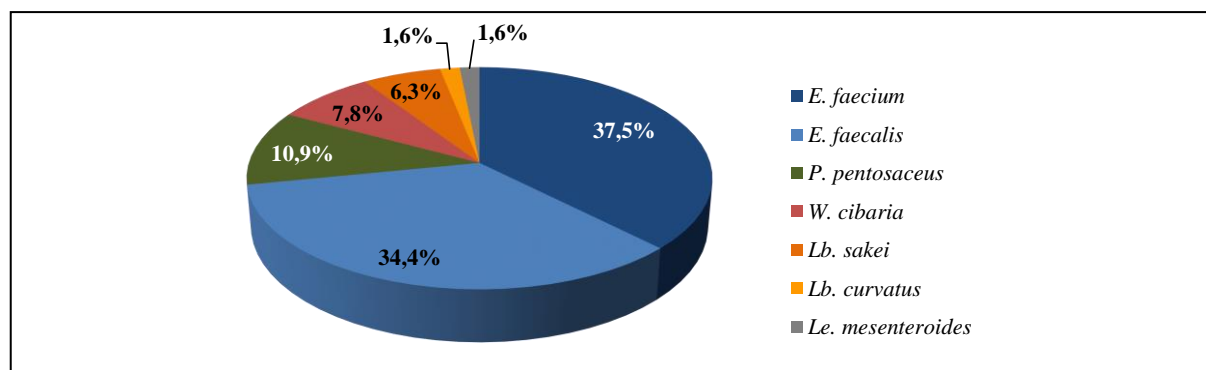


Figura 7.7. Especies de bacterias lácticas (%) identificadas entre las 64 cepas con actividad antimicrobiana de origen marino.

VII.1.4. BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO

Con el objeto de identificar las cepas cuya actividad antimicrobiana no era debida a la competencia por los sustratos del medio de cultivo ni al descenso del pH producido como consecuencia de su metabolismo fermentativo, sino a la producción de bacteriocinas, las 64 bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana directa mediante la técnica ISP (Tabla III.5) se desarrollaron en medio líquido y se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes libres de células de los cultivos neutralizados y esterilizados por filtración (en adelante sobrenadantes) para, posteriormente, evaluar su actividad antagonista mediante la técnica de difusión en agar (TDA) (Cintas *et al.*, 1995) frente a 20 microorganismos indicadores (Tabla III.1). La actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes se cuantificó determinando el diámetro de los halos de inhibición producidos (Fig. 3.1, B), y los resultados obtenidos (Tabla III.7) mostraron que de las 64 cepas con actividad antimicrobiana directa, solamente 25, lo que representa un 39,1% de los aislados, mostraron actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de los cultivos correspondientes. El espectro de acción antimicrobiana de las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas fue similar al obtenido mediante la técnica ISP (Tabla III.7). La actividad antimicrobiana extracelular de los aislados fue muy variable, tanto en lo que respecta a su espectro de acción como a la magnitud (7,8–27,4 mm) y tipo de halos de inhibición obtenidos (nítidos o difusos, con o sin colonias resistentes en su interior y/o periferia, etc.) (Tabla III.7). Todas las bacterias lácticas evaluadas excepto las cepas *P. pentosaceus* LPV57, *Lb. sakei sakei* B11, *Lb. sakei carnosus* SMA17 y *Lb. sakei carnosus* SMM73 mostraron un amplio espectro de acción antimicrobiana, en el que se incluyen *L. monocytogenes* CECT4032 (serotipo 4b), *L. monocytogenes* CECT 935 (serotipo 4b) y *L. monocytogenes* CECT936 (serotipo 1/2b), cepas relacionadas frecuentemente con toxiinfecciones alimentarias, así como diversos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos patógenos y alterantes del pescado, tales como *Sh. putrefaciens*, *Shewanella hanedai*, *C. piscicola*, *C. divergens* y *Br. thermosphacta*.

A continuación, con el objeto de determinar si la actividad antimicrobiana de estas cepas era debida a la producción y liberación al medio extracelular de bacteriocinas, los sobrenadantes se trataron con diversas concentraciones de proteinasa K. Además, se determinó la estabilidad térmica de las posibles bacteriocinas sometiendo los correspondientes sobrenadantes a distintos tratamientos térmicos. Finalizados los tratamientos, se determinó la actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes mediante TDA. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las 25 bacterias lácticas evaluadas se debe a la producción y liberación al medio extracelular de compuesto(s) termorresistente(s) de naturaleza proteica (*i.e.*, bacteriocinas). Los resultados obtenidos por otros investigadores al evaluar la actividad bacteriocinogénica de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa aisladas de diferentes sustratos alimentarios son, generalmente, inferiores a los obtenidos en este trabajo. Así, por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2000) describieron que de 1.340 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en medio sólido aisladas de leche cruda de vaca, oveja y cabra, únicamente 321 cepas, lo que representa un 24%, mostraron actividad antimicrobiana extracelular en los correspondientes sobrenadantes de los cultivos. Porcentajes inferiores han sido descritos para bacterias lácticas aisladas de quesos y yogures (20%) (Yang *et al.*, 2012), leche cruda (12,1%) (Thualt *et al.*, 1991), productos lácteos tradicionales de Bulgaria (0,5%) (Simova *et al.*, 2009) y queso Munster (0,3%) (Ennahar *et al.*, 1996). Sin embargo, Citti (2005) describió la presencia de un elevado porcentaje (84,4%) de bacterias lácticas bacteriocinogénicas en leches y quesos de búfala de Venezuela. Por otra parte, en lo que respecta a los productos cárnicos o vegetales fermentados, se han descrito porcentajes variables de cepas bacteriocinogénicas (11–30%) (Schillinger y Lücke, 1989; Garriga *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Casaus, 1998; Messens y de Vuyst, 2002; Corsetti *et al.*, 2004). El hecho de que las restantes 39 bacterias lácticas aisladas en este trabajo que mostraban actividad antimicrobiana en medio sólido no la presenten en los correspondientes sobrenadantes de los cultivos puede deberse a que: (i) la actividad antimicrobiana detectada mediante la técnica ISP fuese debida a la depleción de los nutrientes del medio y/o al descenso del pH; (ii) estas cepas únicamente produzcan y/o liberen compuestos antimicrobianos extracelulares cuando se desarrollan en medio sólido; (iii) estos compuestos se produzcan en medio líquido pero no son activos a los valores de pH neutro a los que se ajustaron los sobrenadantes, y/o (iv) a que estos compuestos antimicrobianos se sinteticen durante la fase exponencial de crecimiento en medio líquido pero se degraden en la fase estacionaria.

De las 25 cepas bacteriocinogénicas, 20 se identificaron como *E. faecium* (80%) (Fig. 7.8). Conviene destacar que ninguna de las cepas de *E. faecalis* mostró actividad bacteriocinogénica bajo las condiciones experimentales ensayadas, lo que ha sido descrito previamente por otros autores aunque aún no se conocen las causas de este fenómeno (Citti, 2005; Martín, 2006; Poeta *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007a; Sánchez, 2008; Valenzuela *et al.*, 2010). En estudios previos, se han aislado enterococos de origen marino productores de bacteriocinas (Pinto *et al.*, 2009; Tomé *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2010; Todorov *et al.*, 2011b) y, de forma similar, en este trabajo se determinó que, el 83,3% de las cepas de *E. faecium* con actividad antimicrobiana directa aisladas y caracterizadas (20 de 24 cepas) mostraron actividad bacteriocinogénica. En lo que respecta a las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, el

80% (4 de 5 cepas) mostraron actividad bacteriocinogénica, y de éstas, *Lb. sakei* representó el 12% (3 cepas) y *Lb. curvatus* el 4% (1 cepa) del total de cepas con actividad bacteriocinogénica (Fig. 7.8). Por otra parte, solamente el 14,3% (1 de 7 cepas) de *P. pentosaceus* mostró actividad bacteriocinogénica, lo que representa un 4% (Fig. 7.8) del total de cepas bacteriocinogénicas; y por último, conviene destacar que ninguna de las cepas aisladas con actividad antimicrobiana directa de *W. cibaria* ni la cepa de *Le. mesenteroides* mostraron actividad bacteriocinogénica.

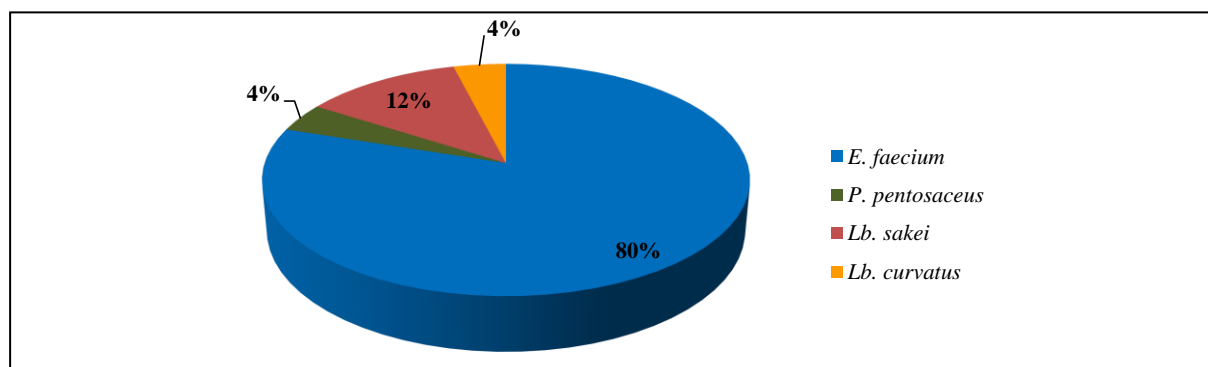


Figura 7.8. Especies de bacterias lácticas (%) identificadas entre las 25 cepas bacteriocinogénicas de origen marino.

Con el objeto de ampliar el conocimiento sobre el espectro de acción de las bacteriocinas producidas por las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas, se evaluó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de los correspondientes cultivos mediante TDA, empleando como microorganismos indicadores otras 17 bacterias Gram-positivas y Gram-negativas alterantes y patógenas de interés en las industrias alimentaria, farmacéutica y veterinaria entre las que se incluyen diversas cepas de *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (Tabla III.1). Los resultados pusieron de manifiesto que la actividad antimicrobiana extracelular de las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas frente a las cepas analizadas de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Salmonella* fue muy variable, tanto en lo que respecta a su espectro de acción como a la magnitud (7,1–18,7 mm) y tipo de los halos de inhibición obtenidos (Tabla III.8). A este respecto, la mayoría de las bacterias lácticas evaluadas mostraron un amplio espectro de acción antimicrobiana, en el que se incluyen cepas de *Cl. botulinum* y *Cl. perfringens*, microorganismos patógenos relacionados con brotes de toxiinfecciones alimentarias; sin embargo, ninguna cepa mostró actividad antimicrobiana frente a *St. aureus* y *Salmonella* spp.

El análisis del espectro de acción (Tablas III.7 y III.8) y la inmunidad cruzada (Tabla III.11) de estas 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas, y considerando además el hecho de que las cepas productoras son siempre inmunes a sus propias bacteriocinas, permitió identificar diversos grupos de actividad antimicrobiana, en los que se incluirían cepas productoras presumiblemente de la(s) misma(s) bacteriocina(s). Por otra parte, el hecho de que muchas de estas cepas ejerzan actividad antimicrobiana frente a las bacterias lácticas bacteriocinogénicas evaluadas (Tabla III.7 y III.8) permite hipotetizar que producen bacteriocinas diferentes y, probablemente, no descritas hasta la fecha.

VII.1.5. DETECCIÓN DE GENES ESTRUCTURALES DE ENTEROCINAS EN LAS CEPAS DE *Enterococcus* spp. DE ORIGEN MARINO

Hasta la fecha se han aislado numerosas cepas de enterococos productoras de enterocinas, principalmente de las especies *E. faecium* y *E. faecalis*, a partir de una gran variedad de alimentos, entre los que se incluyen la leche y los productos lácteos, la carne, los animales de granja y caza (e.g., pollos, patos y palomas), los embutidos crudos curados y otros productos cárnicos fermentados y los vegetales frescos y fermentados (Cintas *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Nilsen *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005; Citti, 2005; Todorov *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2005a; Achemchem *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2006; de Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Martín, 2006; Sánchez *et al.*, 2007b; Cocolin *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007), por lo que la bacteriocinogenicidad es un fenotipo muy extendido entre los enterococos de origen alimentario. La variedad de bacteriocinas producidas por los enterococos es muy amplia, habiéndose caracterizado hasta la fecha (bioquímica y/o genéticamente) más de 50 enterocinas diferentes (Franz *et al.*, 1999a, 2007; Nes *et al.*, 2007; Basanta, 2007). A este respecto, en las 20 cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas aisladas en este trabajo, los genes más abundantes fueron los que codifican la enterocina L50 (L50A y L50B) (EntL50 [EntL50A y EntL50B]) y la enterocina P (EntP) (65 y 60%, respectivamente) (Fig. 7.9), tanto solos como en combinación con otros genes estructurales de enterocinas (Tabla III.10 y Fig. 3.7). Conviene destacar que nuestros resultados revelaron una alta incidencia de cepas que albergan de dos a cuatro genes que codifican enterocinas (Tabla III.10 y Fig. 3.7), en particular *entL50* (*enL50A-entL50B*) y *entP*, lo que está en concordancia con estudios previos (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998a, 2000; Poeta *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007b; Brandão *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011) y confirma que los enterococos tienen un alto potencial genético para producir varias bacteriocinas. Aunque los genes estructurales *ef1097* y *cyl_{LS}* se han detectado mayoritariamente en *E. faecalis* (Hickey *et al.*, 2003; Nilsen *et al.*, 2003; Semedo *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2007; Swe *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010), nuestros resultados y los de otros autores ponen de manifiesto que también pueden encontrarse en otras especies bacterianas como *E. faecium* (Semedo *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2011). Asimismo, en el presente trabajo se describe por primera vez el aislamiento de una cepa de *E. faecium* multibacteriocinogénica que contiene los genes estructurales *ef1097*, *cyl_{LS}*, *entA* y *entB* (Tabla III.10). Además, se ha identificado una cepa de *E. faecium* multibacteriocinogénica con los determinantes génicos *entL50* (*enL50A-entL50B*) e *hirJM79*. La presencia simultánea de *hirJM79* y genes estructurales de bacteriocinas descritas previamente en *E. faecium* (e.g., *entP*, *entqA*, *entA* y/o *entB*) es más común de lo esperado y ha sido también descrita en varias cepas de esta especie aisladas de humanos, mascotas, animales de compañía y pescados de agua salada (Brandão *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011). Por último, la ausencia de genes que codifican bacteriocinas ya descritas en dos cepas de *E. faecium* (*E. faecium* LPP29 y *E. faecium* SMA10) sugiere la producción de, al menos, dos nuevas bacteriocinas (Tabla III.10).

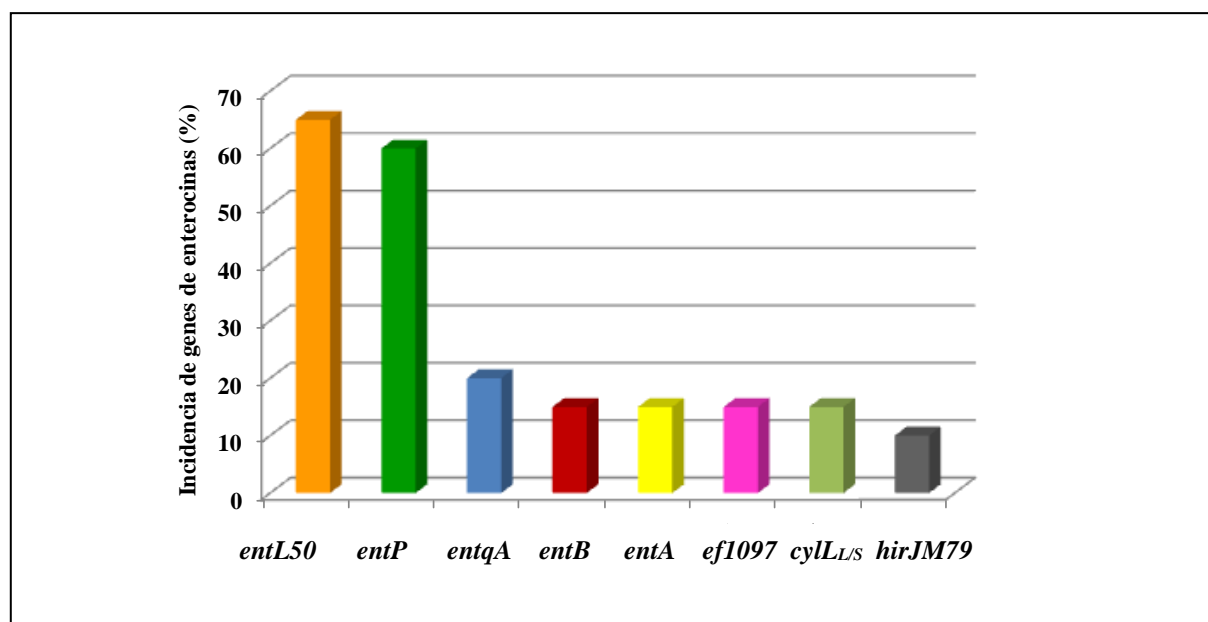


Figura 7.9. Incidencia (%) de genes de enterocinas en las 20 cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas de origen marino.

VII.1.6. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE LAS CEPAS DE *E. faecium* BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO

Los enterococos se consideran microorganismos patógenos humanos oportunistas emergentes ya que causan el 12% de las infecciones nosocomiales y, por lo tanto, constituyen uno de los géneros de mayor importancia en las infecciones hospitalarias (Klare *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Franz *et al.*, 2010). Asimismo, los enterococos poseen un amplio espectro de resistencias naturales (intrínsecas) y adquiridas (transferibles) a antibióticos, además de su resistencia a diversos factores físico-químicos (*e.g.*, bajo pH y altas temperaturas y concentraciones de sal) y condiciones ambientales adversas (Eaton y Gasson, 2001; Klare *et al.*, 2001, 2003; Ogier y Serror, 2008). En este contexto, la supervivencia de los enterococos en el ambiente hospitalario está relacionada con: (i) su resistencia natural a diversos detergentes utilizados en la desinfección y diversos antibióticos de uso común en terapia humana, y (ii) su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. Además, el incremento en el empleo de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de diversas infecciones provoca la selección de enterococos resistentes a antibióticos (ARE, del inglés *Antibiotic Resistant Enterococci*), en algunos casos multirresistentes, y, por lo tanto, origina un aumento de la incidencia de los enterococos en las infecciones nosocomiales (Klare *et al.*, 2003). Por todo ello, en la actualidad existe una gran controversia sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, principalmente de la especie *E. faecalis*, especialmente en lo que respecta a su posible resistencia a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2010). En este contexto, se ha descrito que pueden aislarse con cierta facilidad de los alimentos enterococos resistentes a estos antibióticos (Pavia *et al.*, 2000; del Campo *et al.*, 2001; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Giraffa, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2010); no obstante, hasta el momento no se

ha demostrado la transferencia de los mecanismos de resistencia a enterococos asociados a infecciones humanas (Pavia *et al.*, 2000) y estas cepas de origen alimentario no presentan resistencia a antibióticos de importancia clínica relevante, entre los que se incluyen la ampicilina, gentamicina, penicilina y vancomicina (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Además, conviene destacar que diversos autores han descrito que los enterococos de origen alimentario, principalmente de la especie *E. faecium*, muestran generalmente una sensibilidad a los antibióticos significativamente mayor que las cepas de origen clínico (Aguirre y Collins, 1993; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Silva-Lopes *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007a; Ogier y Serror, 2008; Vankerckhoven *et al.*, 2008). No obstante, a pesar de esta controversia creciente e incesante sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, conviene destacar que los alimentos que contienen enterococos de forma natural se han consumido durante siglos sin riesgos aparentes para la salud humana (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Eaton y Gasson, 2001; Lauková, 2012). Asimismo, algunas cepas de *E. faecium* se utilizan como cultivos iniciadores, protectores, adjuntos y/o probióticos para la elaboración de diversos alimentos (principalmente productos lácteos) (Franz *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2008; Lauková, 2012) y otras cepas están autorizadas por la EFSA como aditivos zootécnicos para la alimentación de terneros, lechones y cerdos, pollos y pavos de engorde (Reglamento (CE) N° 1831/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal).

Actualmente, los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por enterococos resistentes a antibióticos son la ampicilina, la gentamicina y la vancomicina, siendo destacable el hecho de que el empleo extensivo de la vancomicina ha provocado un aumento de enterococos resistentes a este antibiótico (VRE). A este respecto se han descrito hasta la fecha seis fenotipos distintos de resistencia a la vancomicina, cinco adquiridos y uno natural o intrínseco. VanA es el fenotipo de mayor importancia clínica ya que se encuentra ampliamente distribuido en el género *Enterococcus*, principalmente en *E. faecium*, y confiere resistencia a la vancomicina, teicoplanina y avoparcina. VanB es el segundo fenotipo en importancia y las cepas que lo poseen muestran resistencia a niveles variables de vancomicina, aunque todas ellas son susceptibles a la teicoplanina. El fenotipo VanC es intrínseco de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, y confiere resistencia a bajos niveles de vancomicina. Finalmente, los fenotipos VanD, VanE y VanG son de menor relevancia clínica y sólo se han descrito en algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Franz *et al.*, 1999a; Klare *et al.*, 2001, 2003; Kayser, 2003; Ogier y Serror, 2008; Xu *et al.*, 2010). De forma natural, los enterococos son resistentes a los siguientes antibióticos: (i) penicilinas semisintéticas resistentes a β -lactamasa; (ii) ácido nalidíxico; (iii) bajos niveles de aminoglucósidos; (iv) cefalosporinas; (v) estreptograminas (exclusivamente *E. faecalis*); (vi) fluoroquinolonas; (vii) bajos niveles de glucopéptidos (exclusivamente *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*); (viii) bajos niveles de lincosaminas; (ix) monobactams; (x) polimixinas y (xi) sulfonamidas (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001, 2003; Marothi *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, los enterococos pueden adquirir resistencia a diversos antibióticos, tales como: (i) β lactámicos; (ii) ácido fusídico; (iii) altos niveles de aminoglucósidos; (iv) cloranfenicol; (v) estreptograminas; (vi) evernimomicinas; (vii) glicopéptidos; (viii) lincosamidas; (ix)

macrólidos; (x) nitrofurantoína; (xi) oxazolidinonas; (xii) quinolonas; (xiii) rifampicina; (xiv) tetraciclinas, y (xv) trimetoprim (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001, 2003; Marothi *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2010). A este respecto, los principales mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos son la acumulación de mutación(es) en diversos genes cromosómicos y la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia conjugativa desde cepas donadoras, y ambos procesos son consecuencia de la intensa presión selectiva derivada del empleo, muchas veces abusivo, de los antibióticos como agentes terapéuticos y profilácticos en medicina humana y veterinaria. (Klare *et al.*, 2001, 2003; Franz *et al.*, 2010). En la Tabla VII.1 se muestran los porcentajes de susceptibilidad de las 20 cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas de origen marino a la acción antimicrobiana de diversos antibióticos, determinada mediante la técnica de disco sobre agar (Bauer *et al.*, 1966), actualizada y modificada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

Tabla VII.1. Susceptibilidad a diversos antibióticos de las 20 cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas de origen marino^a.

Antibióticos			<i>E. faecium</i> (n=20) ^b		
Mecanismo de acción/ Familia	Concentración (µg/disco)		S	SI	R
Inhibición de la síntesis de la pared celular					
β-lactámicos	Penicilina G	10	100	0	0 (RA)
	Ampicilina	10	100	0	0 (RA)
Glucopéptidos	Vancomicina	30	100	0	0 (RA)
	Teicoplanina	30	100	0	0 (RA)
Inhibición de la síntesis proteica					
Macrólidos	Eritromicina	15	20	80	0 (RA)
Tetraciclinas	Tetraciclina	30	85	0	15 (RA)
Anfenicoles	Cloranfenicol	30	100	0	0 (RA)
Aminoglucósidos	Kanamicina	30	5	30	65 (RI)
	Gentamicina	10	70	30	0 (RI)
		120	100	0	0 (RA)
	Estreptomicina	10	0	0	100 (RI)
Lincosamidas	Clindamicina	2	15	0	85 (RI)
Estructura esteroidea	Ácido fusídico	10	90	10	0 (RA)
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos					
Quinolonas	Ácido nalidíxico	30	0	0	100 (RI)
	Ciprofloxacina	5	85	5	10 (RA)
	Norfloxacina	10	85	0	15 (RA)
Rifamicinas	Rifampicina	5	85	0	15 (RA)
Inhibición de sistemas enzimáticos					
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	300	50	50	0 (RA)

^aResultados interpretados de acuerdo con los criterios de sensibilidad/resistencia establecidos para *Enterococcus* spp. por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). ^bLos resultados se expresan como porcentajes (%). Símbolos: S, sensibilidad; SI, sensibilidad intermedia; R, resistencia; RA, resistencia adquirida, y RI, resistencia intrínseca.

De estos resultados, y considerando los criterios establecidos por CLSI (2003), se deduce que el 100% de las cepas de *E. faecium* fueron sensibles a los antibióticos de relevancia clínica como β -lactámicos (penicilina G y ampicilina) y glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina), así como al cloranfenicol y a altas concentraciones de gentamicina (120 μ g); además, todas las cepas fueron resistentes a la estreptomicina y el ácido nalidíxico (Tabla VII.1). Conviene destacar que *E. faecium* LPP29 presentó sensibilidad a la kanamicina, ninguna cepa fue resistente a bajas concentraciones de gentamicina (10 μ g) y un 15% fueron sensibles a la clindamicina, lo que resulta sorprendente ya que, en general, los enterococos presentan resistencia intrínseca a bajas concentraciones de aminoglucósidos y lincosamidas (Tabla VII.1). De forma similar, ninguna de las cepas de *E. faecium* presentó resistencia a la eritromicina, el ácido fusídico y la nitrofurantoína (Tabla VII.1). Asimismo, el 85% de las cepas (todas excepto *E. faecium* SMF4, *E. faecium* SMF20 y *E. faecium* SMF60) (Tablas III.10 y VII.1) fueron sensibles a la tetraciclina, ciprofloxacino, norfloxacino y rifampicina, lo que reviste una gran importancia si se pretende evaluar la utilización de alguna de estas cepas en la industria alimentaria ya que estos antibióticos se emplean generalmente en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por enterococos resistentes a otros antibióticos.

Por otra parte, la seguridad de los enterococos también está muy cuestionada debido a la posible presencia de factores potenciales de virulencia específicos (moléculas efectoras que potencian la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad), que pueden estar asociados con una o varias de las etapas de la infección. En este contexto, la mayoría de los factores de virulencia descritos hasta la fecha son productos de secreción (*e.g.*, citolisina y gelatinasa) o factores de adhesión (*e.g.*, sustancia de agregación y proteína de superficie de los enterococos), y se han descrito principalmente en *E. faecalis* y, en menor medida, *E. faecium* (Eaton y Gasson, 2001; Garza-Velasco *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Koch *et al.*, 2004; Majhenič *et al.*, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que el 90% de las cepas de *E. faecium* (todas excepto *E. faecium* LPP29 y *E. faecium* SMA10) amplificaron el gen *efaAfm*, que codifica una adhesina característica de las cepas de *E. faecium* con propiedades similares a las proteínas asociadas a la adhesión en los microorganismos del género *Streptococcus*, aunque su función en *E. faecium* es todavía desconocida (Eaton y Gasson, 2001). Asimismo, el 75% de las cepas (todas excepto *E. faecium* LPP29, *E. faecium* SMA7, *E. faecium* SMA10, *E. faecium* SMA36 y *E. faecium* SMA40) amplificaron el gen *ccf*, que codifica una feromona sexual implicada en fenómenos de conjugación plasmídica con actividad quimiotáctica modulando la respuesta inmune y cuya presencia en cepas de *E. faecium* es habitual debido al intercambio de información genética entre *E. faecalis* y *E. faecium* inducido por feromonas (Eaton y Gasson, 2001). Conviene destacar que los aislados *E. faecium* LPP29 y *E. faecium* SMA10 no amplificaron ninguno de los factores de virulencia evaluados en este trabajo (Tabla III.10); sin embargo, las cepas *E. faecium* SMF4, *E. faecium* SMF20, *E. faecium* SM39 y *E. faecium* SMF60 amplificaron la mayoría de los genes que codifican factores de virulencia (Tabla III.10), incluyendo *gelE* (que codifica una metaloendopeptidasa extracelular que hidroliza la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y ciertos péptidos bioactivos, lo que induce a considerar que podría degradar las proteínas de la matriz extracelular, y por lo tanto, facilitar la invasión de los tejidos por los enterococos), *cpd* y *ccf* (que

codifican feromonas sexuales implicadas en fenómenos de conjugación, que junto con las proteínas de exclusión superficial, poseen actividad quimiotáctica modulando la respuesta inmune), *efaAfm* y *efaAfs* (que codifican adhesinas de la pared celular presentes en el suero de las personas portadoras de *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente) y *agg* (que codifica una proteína de agregación involucrada en la adherencia a células eucariotas, agregación celular y conjugación). Asimismo, ninguna de las cepas permitió la amplificación de los genes *esp* (que codifica una proteína de superficie de enterococos, asociada a la membrana celular, relacionada con la evasión de la respuesta inmune) y *cob* (que codifica otra feromona sexual). Por otra parte, la citolisina (Cyl_{L/S}) o β-hemolisina/bacteriocina es considerada una toxina celular cuya doble actividad biológica (hemolítica y bactericida) se debe a la acción conjunta de dos péptidos (Cyl_L y Cyl_S) y está codificada generalmente por plásmidos de respuesta a feromonas sexuales, y ocasionalmente, por el cromosoma. Para la producción de esta toxina es necesaria la expresión de ocho genes localizados en un único operón. Los genes *cylL_L* y *cylL_S* codifican dos precursores peptídicos, que son modificados postraduccionalmente por la proteína CylM. Posteriormente, CylB, un transportador del tipo ABC (sección II.3.3.7.3.1), se ocupa del transporte y secreción de ambas subunidades a través de la membrana celular y de eliminar la secuencia líder de cada una de ellas. A continuación, una serín-proteasa, codificada por *cylA*, elimina un fragmento de seis aminoácidos del extremo N-terminal de cada una de las subunidades, generando los dos péptidos activos. CylI es la proteína de inmunidad encargada de proteger a la célula productora de la actividad antimicrobiana de Cyl_{L/S}. Finalmente, la producción y secreción de Cyl_{L/S} se encuentra regulada por un mecanismo de regulación dependiente de la densidad celular (sistema *Quorum Sensing*) en el que intervienen CylR1 y CylR2 (Franz *et al.*, 1999a; Kayser, 2003; Shankar *et al.*, 2004). La toxina Cyl_{L/S} es el factor de virulencia más importante y está implicado en los siguientes procesos: (i) ruptura de las membranas celulares de bacterias Gram-positivas, eritrocitos y otras células eucariotas; (ii) toxicidad y letalidad de las infecciones, ya que favorece la aparición de los enterococos en el torrente sanguíneo, y (iii) patogenicidad en humanos, ya que su presencia se ha asociado con el incremento del riesgo de muerte (Garza-Velasco *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Koch *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2005). Conviene destacar que, en nuestro trabajo, ninguna de las tres cepas de *E. faecium* que contienen los genes *cylL/S* mostraron actividad β-hemolítica (Tabla III.10). A este respecto, dos de las tres cepas no amplificaron el gen *cylB*, que codifica al transportador ABC, lo cual puede explicar la ausencia de actividad β-hemolítica. Además, la única cepa de *E. faecium* que amplificó el operón *cyl* completo tampoco mostró actividad β-hemolítica, lo cual puede reflejar la existencia de genes silentes, un fenómeno que ha sido previamente descrito en enterococos (Eaton y Gasson, 2001; Semedo *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2007). Conviene destacar que todos los *E. faecium* aislados fueron fenotípicamente hemolisina, gelatinasa y proteasa negativos (Tabla III.10).

Como conclusión, este trabajo demuestra que el pescado, el marisco y los productos de la pesca constituyen nichos ecológicos adecuados para el aislamiento de bacterias lácticas, incluyendo cepas (multi)bacteriocinogénicas, fundamentalmente enterococos, productoras de bacteriocinas descritas previamente y/o nuevas, con un amplio y potente espectro de acción antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria. De

las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino, la cepa *Lb. curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado, destaca por su amplio y potente espectro de acción antimicrobiano (Tablas III.7 y III.8), por lo que se seleccionó para proceder al desarrollo de los siguientes objetivos: (i) evaluación del potencial biotecnológico y su seguridad *in vitro*, lo que incluye la caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas responsables de su actividad antimicrobiana extracelular; (ii) desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco a escala de laboratorio y semiindustrial, y, por último, (iii) producción heteróloga de sus bacteriocinas y detección y cuantificación de su producción por la cepa salvaje y las cepas recombinantes mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas.

VII.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO Y EVALUACIÓN *in vitro* DE LA SEGURIDAD DE *Lactobacillus curvatus* BCS35

En la última década se ha descrito el aislamiento y la caracterización de cepas de *Lb. curvatus* y *Lb. sakei* bacteriocinogénicas y no bacteriocinogénicas, principalmente en productos cárnicos (Holck *et al.*, 1994a; Cocolin *et al.*, 2004; Rantsiou *et al.*, 2005; Najjari *et al.*, 2008; Ben Belgacem *et al.*, 2009; Audenaert *et al.*, 2010; Lorenzo *et al.*, 2010), pero también en productos de la pesca fermentados (Lyhs *et al.*, 1999; Lyhs, 2002; Najjari *et al.*, 2008; Lyhs y Björkroth, 2008), vegetales fermentados (Vogel *et al.*, 1993a; Lee *et al.*, 2004), y, en menor grado, queso (Colombo *et al.*, 2009; Serhan *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado la eficacia de cepas bacteriocinogénicas de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus* para la inhibición de *L. monocytogenes* en diversos productos cárnicos y pesqueros (Katla *et al.*, 2001; Benkerroum *et al.*, 2005; Katikou *et al.*, 2005; Castellano y Vignolo 2006; Ghalfi *et al.*, 2006; Héquet *et al.*, 2007; Dortu *et al.*, 2008).

Por otra parte, la seguridad e inocuidad de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos se ha aceptado durante mucho tiempo (microorganismos GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*, o su equivalente europeo QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*), por lo que se ha sugerido su empleo y/o el de sus metabolitos como bioconservantes para que, formando parte de un sistema de “barreras” u “obstáculos” (Cleveland *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006), permitan garantizar la seguridad y calidad higiénica y prolongar la vida útil de los alimentos que se consumen (Horn *et al.*, 1998; Cleveland *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas (sección II.2.2), las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente como bioconservantes alimentarios para inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos y su empleo permitiría obtener productos más naturales, más saludables y con menos aditivos químicos (sección II.3.3.10.1.1) (Nes *et al.*, 1996; Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007).

En este contexto, con el fin de evaluar el potencial biotecnológico para su posible aplicación como bioconservantes del pescado, en este trabajo se seleccionaron las cuatro cepas bacteriocinogénicas de *Lactobacillus* spp. de origen marino (*Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35) y se procedió a la caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas producidas por *Lb.*

curvatus BCS35, así como a la evaluación *in vitro* de los aspectos de seguridad de esta cepa multibacteriocinogénica.

VII.2.1. DETECCIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA CURVACINA A, SAKACINA P Y SAKACINA Q EN LAS CEPAS DE *Lactobacillus* spp. DE ORIGEN MARINO

Hasta la fecha, se han descrito diversas bacteriocinas producidas por cepas de *Lb. sakei* entre las que se incluyen las siguientes: la sakacina (SakA) (Schillinger y Lucke, 1989; Holck *et al.*, 1992), la sakacina M/lactocina S (Sobrino *et al.*, 1992; Skaugen *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998b), la sakacina P (SakP) (Tichaczek *et al.*, 1994), la sakacina 674 (Holck *et al.*, 1994a), la sakacina B (Samelis *et al.*, 1994), la sakacina K (SakK) (Hugas *et al.*, 1995), la bavaricina MN (Kaiser y Monteville, 1996), la sakacina T (SakT) (Aymerich *et al.*, 2000a), la sakacina G (Simon *et al.*, 2002), la sakacina X (SakX) (Vaughan *et al.*, 2003) y la sakacina Q (SakQ) (Mathiesen *et al.*, 2005) (Tabla II.25). Asimismo, se han descrito bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* entre las que se incluyen la curvacina A (CurA) producida por *Lb. curvatus* LTH1174, aislada de carne fermentada (Tichaczek *et al.*, 1993); la curvaticina 13 de *Lb. curvatus* SB13, aislada de salchichas belgas (Sudirman *et al.*, 1993); la curvaticina FS47 de *Lb. curvatus* FS47, aislada de carne (Garver y Muriana, 1994), y la curvaticina L442 de *Lb. curvatus* L442, aislada de salchicha fermentada de forma tradicional en Grecia (Xiraphi *et al.*, 2006) (Tabla II.25). Por otra parte, la presencia de genes estructurales de bacteriocinas que codifican sakacinas en cepas de *Lb. curvatus* ha sido descrita por diversos autores (Cocolin y Rantsiou, 2007; Héquet *et al.*, 2007). A este respecto, CurA producida por *Lb. curvatus* LTH1174 (Tichaczek *et al.*, 1993) es idéntica a SakA producida por *Lb. sakei* Lb706 (Schillinger y Lucke, 1989) y a SakK de *Lb. sakei* CTC494 (Hugas *et al.*, 1995; Axelsson y Holck, 1995; Aymerich *et al.*, 2000a; Leroy y de Vuyst, 2005). Por otra parte, curvaticina L442 producida por *Lb. curvatus* L442 (Xiraphi *et al.*, 2006) tiene un grado de homología muy alto con SakP producida por diversas cepas de *Lb. sakei*. A este respecto, Cocolin y Rantsiou (2007) propusieron que la bacteriocina producida por *Lb. curvatus* L442 debería ser clasificada como SakP. Más tarde, Héquet *et al.* (2007) describieron la presencia de genes que codifican la bacteriocinas de la clase IIa SakX y SakP, y de la clase IIb SakT (SakT_α y SakT_β), descritas previamente en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003, 2004b), en *Lb. curvatus* 2711. La bacteriocina de la clase IIc SakQ, que parece que está localizada en el mismo operón que SakP (Mathiesen *et al.*, 2005), fue descrita por primera vez en *Lb. sakei* Lb674 y *Lb. sakei* LTH673 (Mathiesen *et al.*, 2005) y después en *Lb. curvatus* L442 y LTH1174 (Cocolin y Rantsiou, 2007). Por todo ello, en este trabajo se evaluó mediante PCR en *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35, la presencia de genes estructurales que codifican sakacinas descritas previamente empleando para ello el correspondiente ADN genómico y cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de los genes estructurales de CurA (*curA*), SakP (*sppA*) y SakQ (*sppQ*) (Tabla IV.2). Los resultados obtenidos revelaron que *Lb. curvatus* BCS35 fue la única cepa que amplificó los fragmentos correspondientes a *sppA* y *sppQ* (Fig. 4.1), lo que sugirió que probablemente se tratara de una cepa multibacteriocinogénica. Con base en esta observación y considerando también su amplio espectro de acción frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria y, especialmente, frente a *L. monocytogenes*, la cepa *Lb. curvatus*

BCS35 se seleccionó para proceder, en primer lugar, a la caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas.

VII.2.2. PURIFICACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE CurG14 Y CurG15, SakP Y PEDIOCINA PA-1(PedPA-1) PRODUCIDAS POR *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 Y *P. acidilactici* 347, RESPECTIVAMENTE, Y SECUENCIA AMINOACÍDICA DE CurG15

El protocolo de purificación de bacteriocinas que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en el pequeño tamaño molecular, la naturaleza catiónica y la relativa hidrofobicidad de estas moléculas (sección II.3.3.5) (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 2001). De forma general, este protocolo incluye: (i) el desarrollo de la cepa bacteriocinogénica en un medio líquido bajo las condiciones óptimas para la producción de las bacteriocinas; (ii) la obtención del correspondiente sobrenadante libre de células; (iii) la precipitación de las proteínas mediante la adición de sulfato amónico y, por último, (iv) diversas etapas cromatográficas, entre las que incluyen las cromatografías de intercambio iónico (aniónico o catiónico), interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*). Asimismo, algunos autores han descrito una variante de este protocolo que incluye una etapa cromatográfica de filtración en gel previa al intercambio catiónico (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Casaus *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001c).

En este trabajo se empleó el protocolo descrito por Casaus *et al.* (1997) para la purificación de las bacteriocinas producidas por las cepas *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347 desarrolladas en caldo MRS a 30°C durante el tiempo necesario para alcanzar la máxima actividad de bacteriocina de acuerdo con los datos obtenidos previamente (Tabla IV.3). La precipitación con sulfato amónico permitió la recuperación del 92, 129 y 43%, respectivamente, de la actividad antimicrobiana presente originalmente en los sobrenadantes de los cultivos (Tabla IV.5). La precipitación con sulfato amónico tiene como objetivo la concentración de las proteínas de los sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos, ya que durante esta precipitación, además de las bacteriocinas, coprecipitan un gran número de proteínas “contaminantes”, en su mayoría procedentes del medio de cultivo, las cuales deben eliminarse en etapas sucesivas del proceso de purificación. La precipitación de las proteínas de los sobrenadantes de los cultivos de *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347 permitió la obtención, tras su centrifugación, de tres fracciones bien diferenciadas: un precipitado, una película flotante y un sobrenadante. La presencia de esta película flotante también se ha detectado tras la precipitación con sulfato amónico de otras bacteriocinas como la enterocina A (EntA) producida por *E. faecium* PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), EntP producida por *E. faecium* P13 (Casaus, 1998) e hiracina JM79 (HirJM79) producida por *Enterococcus hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b) y, dado que puede llegar a contener hasta el 97% de la bacteriocina inicial (Muriana y Klaenhammer, 1991), debe recogerse y mezclarse con el precipitado. Por otra parte, la cromatografía de filtración en gel es una técnica cromatográfica introducida con éxito en el proceso de purificación de algunas bacteriocinas como EntA producida por *E.*

faecium P21 (Herranz *et al.*, 2001a) y PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a), EntP producida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y *Pc. pastoris* X-33t1 (Gutiérrez *et al.*, 2005a), HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b) y PedPA-1 producida por *P. acidilactici* 347 (Martínez *et al.*, 1998), con el objeto de eliminar las sales que interfieren negativamente en la cromatografía de intercambio catiónico, ya que inhiben la unión de las bacteriocinas (péptidos poco catiónicos y de pequeño tamaño molecular) a los ligandos aniónicos unidos covalentemente a la matriz cromatográfica. Tras realizar esta etapa de purificación y la posterior cromatografía de intercambio catiónico, los rendimientos de las bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* BCS35, SakP de *Lb. sakei* LTH673 y PedPA-1 de *P. acidilactici* 347 fueron del 44, 67 y 37%, respectivamente, (Tabla IV.5). La recuperación de la actividad antimicrobiana tras la cromatografía de interacción hidrofóbica fue del 62, 7 y 83% (Tabla IV.5), respectivamente, lo que representó una actividad antimicrobiana mayor que la obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico para las bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* BCS35 y para PedPA-1, pero no para SakP, cuya recuperación disminuyó considerablemente. No obstante, este fenómeno de aumento de actividad antimicrobiana también se ha detectado, en diversas etapas cromatográficas, durante la purificación de otras bacteriocinas como SakA y SakP producidas por *Lb. curvatus* LTH1174 y *Lb. curvatus* LTH673, respectivamente (Tichaczek *et al.*, 1992), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995) así como por las cepas recombinantes *Saccharomyces cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (Basanta, 2007), PedPA-1 producida por *P. acidilactici* Z102 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), EntP producida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997), EntA producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996) y *E. faecium* PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a) e HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b). Por último, los resultados obtenidos tras la cromatografía de fase inversa pusieron de manifiesto para *Lb. curvatus* BCS35 la existencia de dos fracciones diferentes con actividad antimicrobiana (fracciones A y B) (Tabla IV.5), y con un rendimiento del 11 y 19% respectivamente, (Tabla IV.5); mientras que los rendimientos para *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347 fueron del 2 y 113 %, respectivamente (Tabla IV.5) y, en ambos casos, se obtuvo una única fracción final con actividad antimicrobiana. Por otra parte, el incremento de la actividad antimicrobiana específica de estas fracciones con respecto a la de los sobrenadantes originales fue mayor en *P. acidilactici* 347, seguida de *Lb. curvatus* BCS35 y, por último, *Lb. sakei* LTH673 (91.492; 22.420 y 30.343, y 13.514 veces, respectivamente) (Tabla IV.5). De forma general, el hecho de que la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas tras las cromatografías de interacción hidrofóbica y/o fase inversa sea mayor que tras la cromatografía de interacción catiónica puede deberse a que durante el proceso de purificación se eliminan compuestos inhibidores de la actividad biológica de estos péptidos antimicrobianos o bien a que los medios polares favorecen su actividad biológica (Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 1998a; Herranz, 2001).

La pureza y masa molecular de las fracciones obtenidas se determinaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) en la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid), dando como resultado que las fracciones A y B de *Lb. curvatus* BCS35 presentan una masa molecular de 4.460,97 y 4.362,65 Da, respectivamente (Fig. 4.2, A y B). Estos resultados ponen de manifiesto que la potente actividad antimicrobiana extracelular de *Lb.*

curvatus BCS35 es debida a la producción y liberación al medio extracelular de, al menos, dos bacteriocinas, denominadas curvacina G14 y curvacina G15 (CurG14 y CurG15, respectivamente). La pureza y masa molecular de SakP y PedPA-1 obtenidas de *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347, respectivamente, se determinaron también por MALDI-TOF MS, lo que permitió confirmar que en ambos casos se trataba de un solo péptido con la masa molecular esperada (4.435,14 y 4.624,52, Da, respectivamente) (Fig. 4.2, C y D). Por otra parte, la determinación mediante degradación de Edman de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina CurG15 purificada (fracción B) de *Lb. curvatus* BCS35 permitió la obtención de la siguiente secuencia: KYYGNGLSXNKSGXSVDWSKAISIIGNNAVADLTTG (Tabla IV.6), donde las X en las posiciones 9 y 14 indican ciclos en blanco en los que no se detectó la presencia de ningún aminoácido conocido. Conviene destacar que en esas posiciones es razonable esperar que los residuos correspondan a la cisteína (Cys), que forma el correspondiente puente disulfuro, y, por lo tanto, no da señal (ciclos en blanco) en la reacción de degradación de Edman (Cys no es derivatizado por la degradación de Edman). Según estos resultados, CurG15 es idéntica a SakX, una bacteriocina de la clase IIa previamente identificada en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), excepto por la presencia de un residuo de ácido aspártico (D, Asp) en lugar de asparragina (N, Asn) en la posición 32 de la bacteriocina madura (Tabla IV.6).

VII.2.3. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE CurG14, CurG15, SakQ Y SakT (SakT α y SakT β) DE *Lb. curvatus* BCS35

Con el objeto de determinar la secuencia nucleotídica del gen estructural de CurG14, el amplicón de 182-pb obtenido con los cebadores específicos del gen estructural de SakP (*sppA*) se purificó y, posteriormente, se determinó su secuencia nucleotídica mediante el método de finalización de cadena en el Servicio de Secuenciación de ADN (Sistema Genómicos, Valencia). Con base en la secuencia nucleotídica obtenida, se diseñaron nuevos cebadores específicos (Tabla IV.2), y, después de digerir el ADN total de *Lb. curvatus* BCS35 con enzimas de restricción, los fragmentos se ligaron en un vector de clonación (pCR-Blunt II-TOPO), previamente digerido con la misma enzima de restricción, para proceder a su secuenciación nucleotídica mediante PCR con los cebadores específicos diseñados previamente y cebadores específicos del vector (Tabla IV.2). La secuenciación nucleotídica de los productos de PCR resultantes permitió la identificación de 1.182-pb, y el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida reveló la presencia de tres marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) correspondientes al: (i) gen que codifica un regulador de respuesta (*sppR*); (ii) gen estructural de CurG14 (*sppA*), y (iii) gen de la proteína de inmunidad (*spiA*) de esta bacteriocina (Figs. 4.3 y 4.4). La secuencia nucleotídica obtenida resultó ser idéntica a la del operón de SakP previamente descrito en cepas de *Lb. curvatus* (Cocolin y Rantsiou, 2007), y sólo difiere de la secuencia descrita en *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1994) en un nucleótido en la posición 566 (T en lugar de C), lo que tiene como resultado la sustitución de un residuo de histidina (His) por uno de tirosina (Tyr) en la posición 12 de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina madura (Tyr12/His12) (Tabla VII.2).

Por otra parte, una vez determinada la secuencia aminoacídica de CurG15 (SakX) producida por *Lb. curvatus* BCS35, se procedió al diseño de cebadores degenerados (Tabla IV.2) que permitiesen la determinación de la secuencia nucleotídica de su gen estructural. Para ello, el ADN purificado de *Lb. curvatus* BCS35 se digirió con enzimas de restricción y los fragmentos generados se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO antes de proceder a su secuenciación nucleotídica. La secuenciación nucleotídica de los fragmentos génicos procedentes de la amplificación por PCR de mezclas de reacción con cebadores degenerados diseñados de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina purificada y de los cebadores del vector permitió determinar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN de 1.743-pb cuyo análisis reveló la presencia de cinco ORFs que corresponden a: (i) los genes estructurales de SakT (*sakT_α* y *sakT_β*); (ii) el gen de la proteína de inmunidad (*sakI_T*); (iii) el gen estructural de SakX (*sakX*), y (iv) el gen de su proteína de inmunidad (*sakI_X*) (Figs. 4.5 y 4.6). La secuencia obtenida resultó ser idéntica a la obtenida para el *cluster* sakacina TX descrito previamente en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003), excepto por una diferencia en el nucleótido 340 (G en lugar de T) en *sakT_α*, lo que tiene como resultado la sustitución de un residuo de glicina (Gly) por uno de valina (Val) en la posición 40 de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina SakT_α madura (Gly40/Val40) (Tabla IV.6). Conviene destacar que no se confirmó la diferencia detectada por degradación de Edman en la secuencia de la CurG15 (Asp en vez de Asn en posición 32, Tabla IV.6), por lo que se deduce que la secuencia de CurG15 es idéntica a la de SakX descrita previamente en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2003).

Por último, mediante el empleo de cebadores específicos para el gen estructural de SakQ (*sppQ*) y ADN de *Lb. curvatus* BCS35, se obtuvo un producto de PCR de 189-pb. El amplicón se purificó y secuenció (Fig. 4.8), revelando una secuencia genética idéntica a la de *sppQ* de *Lb. curvatus* L442 y *Lb. curvatus* LTH1174 descritas previamente (Cocolin y Rantsiou, 2007); sin embargo, la secuencia de SakQ de las cepas de *Lb. curvatus* muestran cinco aminoácidos menos (AWGAG) que la descrita para SakQ de *Lb. sakei* LTH673 (Mathiesen *et al.*, 2005) (Tabla IV.6).

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto que la actividad antimicrobiana extracelular de *Lb. curvatus* BCS35 es debida a la producción de, al menos, dos bacteriocinas: (i) curvacina G14, similar a SakP excepto por la presencia de Tyr12 en lugar de His12, y (ii) curvacina G15, idéntica a SakX. A este respecto, la producción de varias bacteriocinas por una sola cepa ha sido descrita previamente para otras bacterias lácticas como *E. faecium* (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 2000d), *Leuconostoc mesenteroides* (Revol-Junelles *et al.*, 1996; Papathanasopoulos *et al.*, 1997), *Lactococcus lactis* (van Belkum *et al.*, 1989), *Lactobacillus plantarum* (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Anderssen *et al.*, 1998; Prins *et al.*, 2010), *Carnobacterium piscicola* (Quadri *et al.*, 1994; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996) y *Streptococcus mutans* (Nes *et al.*, 2007). Por otra parte, la producción de la misma bacteriocina o de bacteriocinas análogas por cepas y especies diferentes y aisladas de nichos distintos se ha descrito frecuentemente y, generalmente, se ha atribuido a la transferencia horizontal de los genes correspondientes (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*), un mecanismo que ha contribuido a la evolución, adaptación y diversificación de las bacterias lácticas (Bačun-Družina *et al.*, 2009; Nyquist *et al.*, 2011; O'Shea *et al.*, 2011; Rankin *et al.*, 2011; Broadbent *et al.*, 2012; Morelli *et al.*, 2012). Así, además de la presencia de genes estructurales de sakacinas en cepas de *Lb. curvatus*, la presencia del gen de PedPA-1 descrito por primera vez en *P.*

acidilactici PAC 1.0 (Marugg *et al.*, 1992) se ha descrito también en otras cepas como, entre otras, *Pediococcus parvulus* ATO34 (Bennik *et al.*, 1997) y *Lb. plantarum* WHE92 (Ennahar *et al.*, 1996); la piscicocina 126 se ha aislado de *C. maltaromaticum* UAL26 (Gursky *et al.*, 2006) y *C. piscicola* JG126 (Jack *et al.*, 1996); EntA se ha detectado en cepas de *E. faecium* aisladas de diferentes nichos, como, por ejemplo, chorizo (*E. faecium* T136) (Casaus, 1998), salchichas fermentadas (*E. faecium* CTC492) (Aymerich *et al.*, 1996), queso (*E. faecium* WHE 81) (Ennahar *et al.*, 2001) y pasta de arroz japonesa (*E. faecium* N15) (Losteinkit *et al.*, 2001). Asimismo, aunque también se ha descrito previamente la producción de bacteriocinas pertenecientes a diferentes clases en una misma cepa (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 2000d; Vaughan *et al.*, 2003, 2004b; Cotter *et al.*, 2005b; Mathiesen *et al.*, 2005; Cocolin y Rantsiou, 2007; Héquet *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Ghalfi *et al.*, 2010), ésta es la primera vez que se describe la presencia de genes estructurales que codifican bacteriocinas de la clase IIa (CurG14 y CurG15), clase IIb (SakT_α y SakT_β) y clase IIc (SakQ) en una sola cepa del género *Lactobacillus*. Nuestros resultados sugieren que la potente actividad antimicrobiana extracelular de *Lb. curvatus* BCS35 es debida a la acción combinada de estas bacteriocinas; sin embargo, esta hipótesis debe confirmarse mediante estudios complementarios que incluyan la purificación de SakT (SakT_α y SakT_β) y/o SakQ para confirmar que estas bacteriocinas son producidas por esta cepa y para establecer su contribución individual a la actividad antimicrobiana total de esta cepa multibacteriocinogénica.

VII.2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ESPECÍFICA DE LAS BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa PURIFICADAS A HOMOGENEIDAD

A pesar de su gran similitud estructural, las bacteriocinas de la clase IIa difieren de forma significativa en su espectro de acción antimicrobiana (Dridier *et al.*, 2006), por lo que estos péptidos resultan especialmente adecuados para el análisis de la relación entre la estructura y la función biológica (espectro y potencia antimicrobiana) (Eijsink *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 1998b; Guyonnet *et al.*, 2000; Katla *et al.*, 2003). El procedimiento de purificación empleado en este trabajo permitió la obtención de cantidades suficientes de CurG14 (variante de SakP), CurG15 (SakX), SakP y PedPA-1 purificadas a homogeneidad, lo cual supone el primer requisito para comparar su espectro de acción antimicrobiana, así como su actividad antimicrobiana específica. La comparación de la actividad antimicrobiana específica de estas cuatro bacteriocinas pertenecientes a la clase IIa (Tabla IV.7) mostró que PedPA-1 es la bacteriocina más activa frente la mayoría de los microorganismos indicadores empleados. Al comparar CurG15 (SakX) con SakP, la determinación del ratio de la actividad antimicrobiana específica puso de manifiesto que CurG15 (SakX) es similar o más activa frente a *Listeria* spp.; sin embargo, ambas bacteriocinas mostraron una potencia similar frente a la mayoría de las especies de bacterias lácticas utilizadas como microorganismos indicadores. Por otra parte, la comparación de la actividad de CurG15 (SakX) con PedPA-1 reveló que CurG15 (SakX) ejerce una actividad antimicrobiana ligeramente superior frente a *Listeria* spp., y mucho menor frente a las bacterias lácticas. Asimismo, al comparar la actividad antimicrobiana de CurG14 (variante de SakP) con la de otras bacteriocinas purificadas, CurG14 (variante de SakP) resultó ser menos activa que SakP, PedPA-1 y CurG15 (SakX) frente a casi todos los indicadores evaluados, lo que puede explicarse por la relación estructura-actividad de las

bacteriocinas de la clase IIa, aspecto que ha sido minuciosamente estudiado y revisado por diversos autores (Kazazic *et al.*, 2002; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008; Rihakova *et al.*, 2009). A este respecto, en un estudio previo, Eijsink *et al.* (1998) compararon la actividad antimicrobiana de cuatro bacteriocinas purificadas (incluyendo SakP y PedPA-1) frente a un gran número de microorganismos indicadores y observaron que SakP tiene mucha menos actividad frente a las bacterias lácticas, lo cual coincide con nuestros resultados. No obstante, en el estudio realizado por Eijsink *et al.* (1998), se obtuvieron resultados distintos a los descritos en este trabajo, ya que SakP y PedPA-1 fueron igualmente efectivos frente a *Listeria* spp., mientras que nuestros resultados revelaron que la actividad antimicrobiana de PedPA-1 es mayor que la de CurG14 (variante de SakP) y SakP.

Con base en su estructura primaria, las bacteriocinas de la clase IIa pueden dividirse en 2 regiones: (i) región N-terminal, hidrofílica, catiónica y altamente conservada, y (ii) región C-terminal, hidrofóbica y/o anfifílica y menos conservada (Kazazic *et al.*, 2002). La estructura tridimensional de diversas bacteriocinas de la clase IIa se ha elucidado mediante resonancia magnética nuclear (RMN), revelando que la región N-terminal forma un dominio tipo lámina β que está estructuralmente estabilizado por un puente disulfuro, mientras que la región C-terminal se organiza en una o dos hélices α que, a menudo, terminan con una “cola” que se dobla hacia la hélice α , de forma que se crea una estructura similar a una horquilla (Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Haugen *et al.*, 2008) (Fig. 7.10). Algunas bacteriocinas de la clase IIa, como PedPA-1, contienen un puente disulfuro adicional en la región C-terminal, el cual desempeña un papel importante en la estabilización de su estructura tridimensional (Uteng *et al.*, 2003; Fimland *et al.*, 2005) (Fig. 7.10). A este respecto, se ha comprobado que estas bacteriocinas, que son estructuralmente más estables que las que sólo contienen un puente disulfuro (*e.g.*, CurG14, SakP) muestran, además, una mayor actividad antimicrobiana, especialmente a elevadas temperaturas (Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Rihakova *et al.*, 2009). Por lo tanto, el mayor espectro de acción antimicrobiana descrito en este trabajo para PedPA-1 en comparación con SakP,

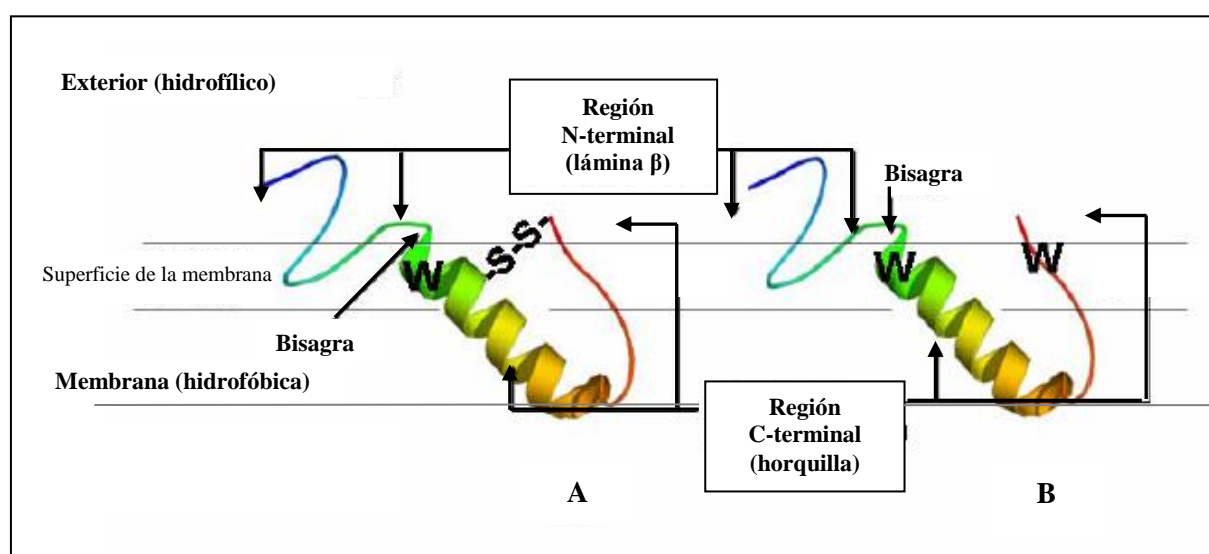


Figura 7.10. Estructura y orientación en la membrana de bacteriocinas de la clase IIa. Bacteriocina de la clase IIa donde la estructura en “horquilla” de la región C-terminal está estabilizada con un puente disulfuro (S-S) (*e.g.*, PedPA-1) (A), y un residuo de triptófano (W) localizado en la interfaz, cerca del final de la región C-terminal (*e.g.*, SakP y CurG14) (B). Adaptado de Haugen *et al.* (2008).

CurG14 (variante de SakP) y CurG15 (SakX) (bacteriocinas sin puente disulfuro adicional) no resulta sorprendente. Asimismo, conviene mencionar que la mayoría de las bacteriocinas que no contienen este puente disulfuro adicional (*e.g.*, CurG14 [variante de SakP] y SakP), poseen un residuo de triptófano (Trp) cerca del final de la región C-terminal (Trp41 en SakP, CurG14 y SakX) (Fig. 7.10), lo que confiere estabilidad a la estructura en “horquilla” (Fimland *et al.*, 2002b). Conviene destacar que estas bacteriocinas, especialmente SakP y SakX, son muy activas frente a *Listeria* spp. pero no tanto frente a las bacterias lácticas, al contrario que PedPA-1, lo que las convierte en excelentes candidatas para ser empleadas como agentes anti-*Listeria* en alimentos, tanto añadiendo la bacteriocina purificada como un aditivo alimentario como empleando la cepa bacteriocinogénica como cultivo protector.

Por otra parte, diversos estudios de mutagénesis dirigida e interacción de péptidos han demostrado que la región N-terminal media la unión inicial de las bacteriocinas de la clase IIa a la membrana de la célula diana (cargada negativamente) a través de interacciones electrostáticas (Chen *et al.*, 1997b; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999; Kazazic *et al.*, 2002; Uteng *et al.*, 2003; Fimland *et al.*, 2006). Asimismo, se ha propuesto que la región C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa es importante en la determinación de su especificidad frente a las células diana, ya que variantes mutadas en la región C-terminal difieren a menudo de la cepa salvaje en su especificidad frente a la célula diana (Fimland *et al.*, 2000, 2002). Además, la especificidad de bacteriocinas híbridas construidas uniendo las regiones N- y C-terminal de diferentes bacteriocinas de la clase IIa es similar a la especificidad del péptido del que deriva la región C-terminal, indicando que ésta es responsable de su especificidad (Johnsen *et al.*, 2005a). El papel de los residuos cargados en la unión de SakP a la membrana de la célula diana, en su potencia y especificidad se ha estudiado previamente mediante mutagénesis dirigida (Kazazic *et al.*, 2002). A este respecto, SakP contiene un residuo cargado negativamente (Asp17) y cinco residuos cargados positivamente (Lys1, Lys22, Lys43, His8 e His12), los cuales, con la excepción de Lys43, se encuentran en la región N-terminal de la bacteriocina (Fig. 7.11). Entre las mutaciones que provocan que SakP sea menos catiónica, las que resultan en la sustitución aminoacídica en la posición 12 (Thr12/His12) son las más perjudiciales en términos de potencia antimicrobiana de la bacteriocina (Kazazic *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, se describe que CurG14 es una variante salvaje de SakP que contiene un residuo cargado positivamente menos en la parte N-terminal (Tyr12/His12) (Tabla VII.2). La comparación de la actividad antimicrobiana de CurG14 y SakP purificadas a homogeneidad mostró que CurG14 tiene una potencia antimicrobiana reducida frente a la mayoría de los microorganismos indicadores; sin embargo, como era de esperar, tiene la misma especificidad antimicrobiana. La reducción de la potencia antimicrobiana depende del microorganismo indicador, variando de 10 (*L. monocytogenes* CECT932) a 1.000 veces (*L. monocytogenes* CECT4032). Por lo tanto, nuestros resultados confirman la importancia de la zona de carácter catiónico en la mitad de la región N-terminal de SakP/CurG14 para la interacción electrostática inicial de las bacteriocinas con la membrana de la célula diana para determinar su potencia antimicrobiana y, en combinación con la región C-terminal, su especificidad antimicrobiana.

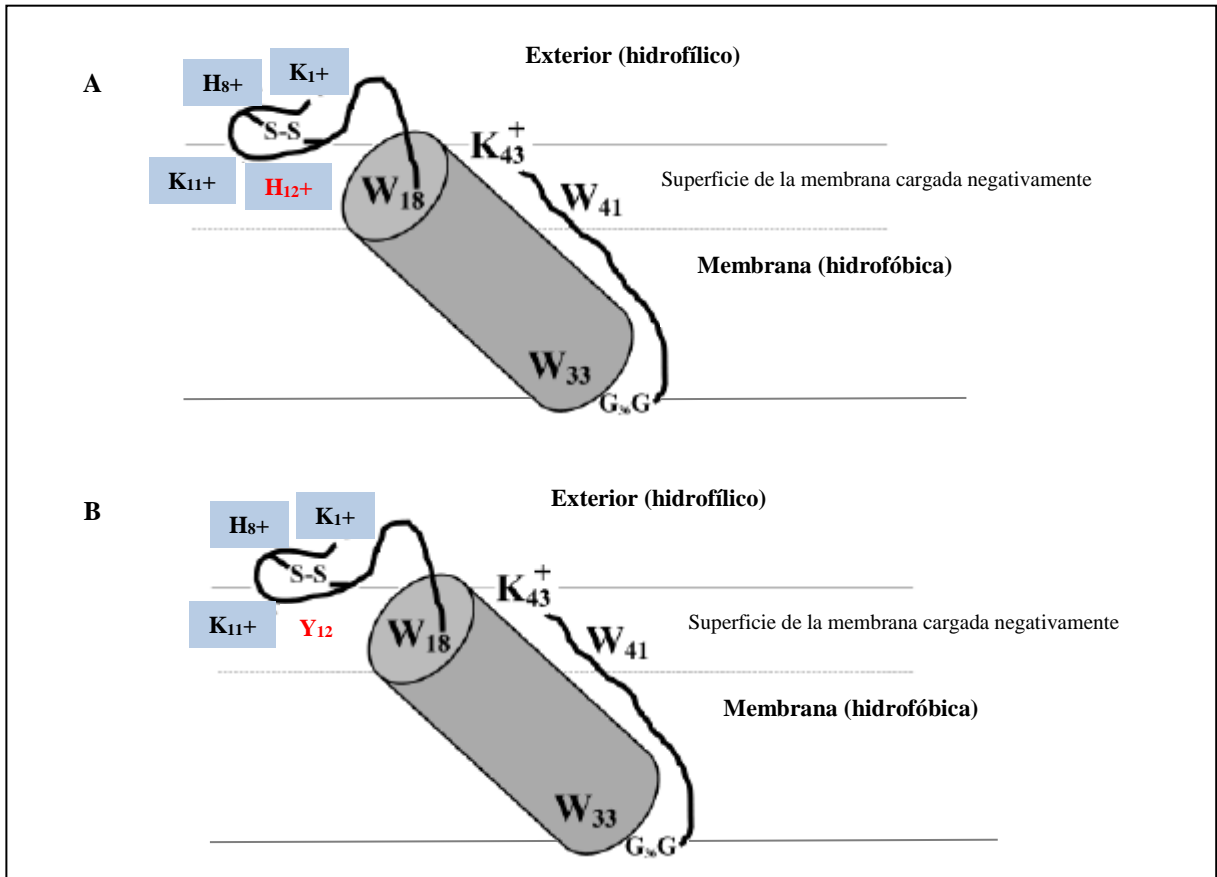


Figura 7.11. Modelo de interacción de SakP (A) y CurG14 (B) con la membrana de la célula diana. Los residuos de la región N-terminal cargados positivamente están coloreados en azul. La diferencia Tyr12/His12 entre CurG14 y SakP, respectivamente, está resaltada en rojo. *Adaptado de Fimland et al. (2002b).*

Tabla VII.2. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de CurG14 (variante de SakP), CurG15 (SakX), SakP y PedPA-1.

Bacteriocina	Bacteriocina madura ^a										Referencias
	1	10	20	30	40						
SakP	K Y Y G N G V H	C G K H S C T V D	W G T A I G N I G N N A A N W A T G G N A G W N K	Tichaczek <i>et al.</i> (1994)							
CurG14	K Y Y G N G V H	C G K Y S C T V D	W G T A I G N I G N N A A N W A T G G N A G W N K	Este trabajo							
PedPA-1	K Y Y G N G V T	C G K H S C S V D	W G K A T T C I I N N G A M A W A T G G H Q G N H K C	Marugg <i>et al.</i> (1992)							
CurG15	K Y Y G N G L S	C N K S G C S V D	W S K A I S I I G N N A V A N L T T G G A A G W K S	Este trabajo							
	* * * * *	: * . *	. * : * * * . *	* * * . .	: * * *	*	:	.			

^aLa diferencia en la secuencia de aminoácidos está resaltada en rojo. La secuencia consenso N-terminal conservada de las bacteriocinas de la clase IIa (YGNGVxC) está subrayada, los residuos de cisteína (C), que forman el puente disulfuro, están resaltados en azul y los residuos de triptófano (W) centrales se muestran en verde. Los residuos cargados de la bacteriocina madura están representados en cajas azules. Símbolos: (*) significa que el mismo residuo aminoacídico se encuentra en todas las secuencias en la misma posición; (:) significa que los residuos aminoacídicos en esta localización son muy similares; (.) significa que los residuos aminoacídicos en esta posición son más o menos similares en su tamaño y/o disposición espacial; la ausencia de símbolo significa que los residuos aminoacídicos en esa localización no presentan propiedades comunes predominantes.

VII.2.5. EVALUACIÓN *in vitro* DE LA SEGURIDAD DE *Lb. curvatus* BCS35

La mayoría de las especies del género *Lactobacillus*, incluida *Lb. curvatus*, han sido reconocidas con el estatus QPS por la EFSA; sin embargo, la identificación en los últimos años de resistencias a antibióticos en bacterias lácticas de origen alimentario ha motivado un gran interés y preocupación, ya que estos microorganismos, incluidos los lactobacilos, pueden actuar como reservorios de genes de

resistencia a antibióticos que posteriormente pueden ser transferidos a bacterias comensales o patógenas del hombre y los animales (Bernardeau *et al.*, 2008). En consecuencia, los productos fermentados han recibido una creciente atención como posibles vehículos para diseminar genes de resistencia a antibióticos, con el consecuente riesgo de su transmisión horizontal a otras bacterias lácticas y/o bacterias patógenas (Danielsen y Wind, 2003; Hummel *et al.*, 2007b; Bernardeau *et al.*, 2008; Comunian *et al.*, 2010). A este respecto, la EFSA ha actualizado recientemente el criterio utilizado en la evaluación de microorganismos resistentes a antibióticos de importancia clínica y veterinaria (EFSA, 2008a, 2011), y establece la obligatoriedad, antes de comercializar un cultivo iniciador y/o protector o un probiótico, de verificar, al menos, la ausencia de genes de resistencia a antibióticos transmisibles. A este respecto, la evaluación de la resistencia a antibióticos de la cepa *Lb. curvatus* BCS35 se llevó cabo mediante el ensayo de microdilución en caldo (Klare *et al.*, 2005) frente a 14 antibióticos de relevancia clínica pertenecientes a diferentes grupos. Según nuestros resultados, *Lb. curvatus* BCS35 puede considerarse una cepa segura, ya que es sensible a todos los antibióticos especificados como relevantes por la EFSA (EFSA, 2008a, 2011) (Tabla IV.8) y no posee actividad hemolítica, gelatinasa y proteasa.

Finalizados los estudios descritos anteriormente, se procedió a la caracterización inmunoquímica y genética de *Lb. curvatus* BCS35, una cepa multibacteriocinogénica de origen marino que puede considerarse segura y que produce, al menos, dos bacteriocinas de la clase IIa, CurG14 (una variante de SakP) y CurG15 (SakX), así como a la evaluación *in situ* de su aplicación como bioconservante del pescado fresco recién capturado como parte de una tecnología de barreras u obstáculos.

VII.3. BIOCONSERVACIÓN DEL PESCADO FRESCO, PESCADILLA (*Merluccius merluccius*) Y GALLO (*Lepidorhombus boscii*), UTILIZANDO BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN MARINO

La actividad pesquera obtiene uno de los productos alimenticios más perecederos y con los que se comercia internacionalmente; por lo tanto, es necesaria una industria y unos medios de conservación y transporte, así como unas redes de comercialización, que permitan mantener una calidad higiénico-sanitaria óptimo para el consumidor final (FAO, 2004b), lo que es especialmente importante en las zonas pesqueras en las que la flota faena a una gran distancia de su puerto base, como es el caso de la flota pesquera española y, concretamente, la flota gallega. A este respecto, Galicia es la región de España con el mayor número de embarcaciones en su flota (sección II.1.4.2) y el mayor volumen de desembarco de pescado (Xunta de Galicia, 2008, 2009), lo que la convierte en una de las principales regiones pesqueras de Europa y el mundo, no sólo por la importancia de sus desembarcos sino también por la variedad de embarcaciones que se emplean en sus pesquerías (Vázquez-Rowe *et al.*, 2011b). En consecuencia, Galicia es una región estratégica para implementar medidas que conduzcan a un incremento de la seguridad y calidad higiénico-sanitaria y organoléptica del pescado fresco.

Inmediatamente después de la captura del pescado, tienen lugar diversos cambios químicos y biológicos llevados a cabo por las propias enzimas del pescado (cambios autolíticos) y por

microorganismos (cambios microbiológicos), lo que finalmente provoca su descomposición y deterioro (Huss, 1999) (sección II.1.5.3). La mayor parte de las operaciones de procesamiento posteriores tienen como objetivo ralentizar estos procesos para que el pescado llegue al consumidor lo menos deteriorado posible. En este contexto, el gallo, *Lepidorhombus* spp. (*L. boscii* y *L. whiffiagonis*) y la pescadilla, *Merluccius merluccius*, son las especies demersales más importantes de la flota gallega. Estos pescados son capturados por distintos tipos de buques arrastreros en pesquerías multiespecie (Sánchez *et al.*, 1998) en los stocks del Norte (Divisiones ICES VIIa, b, d y VII) y del Sur (Divisiones ICES VIIIc y IXa) (Fig. 7.12) y poseen un valor comercial especialmente importante (Vázquez-Rowe *et al.*, 2011a y 2011b), por lo que fueron las especies de pescado seleccionadas en este trabajo para llevar a cabo los estudios de bioconservación. La investigación y el desarrollo de técnicas de conservación tras la captura para controlar la carga microbiana en estas especies de pescado es esencial para: (i) incrementar su vida útil;

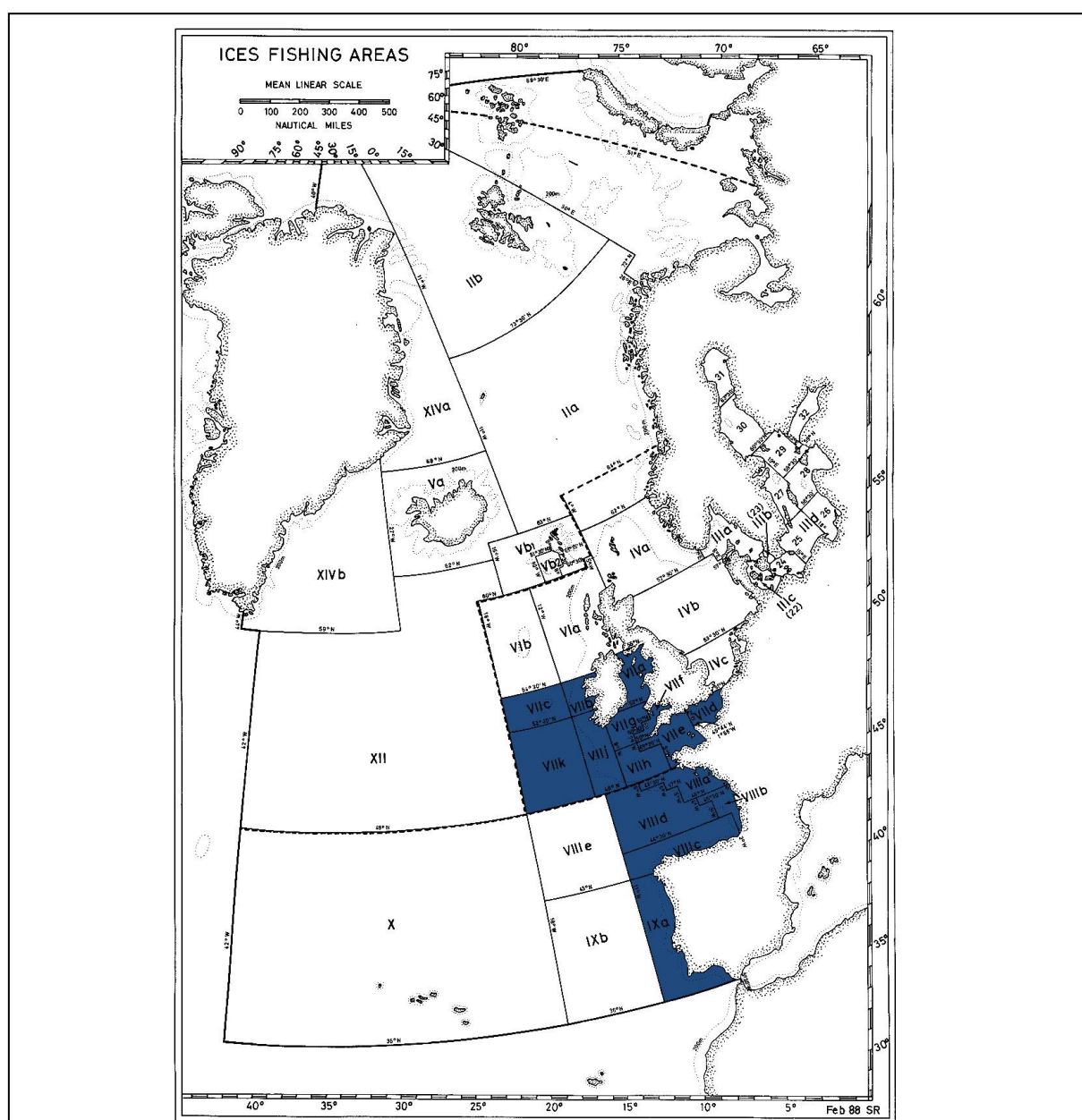


Figura 7.12. Mapa de las zonas ICES. Las divisiones VII, VIIIa, b, c y d y IXa, en las que se pescan mayoritariamente *Lepidorhombus* spp. y *M. merluccius* por la flota arrastrera gallega aparecen señaladas en azul.

(ii) reducir las pérdidas físicas, organolépticas y nutricionales, y (iii) preservar la calidad y seguridad del producto final (Gram y Huss, 1996). En este contexto, la bioconservación, que se define como la extensión de la vida útil y mejora de la seguridad alimentaria mediante el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002), aparece como una tecnología interesante, de fácil aplicación y rentable económicamente que, combinada con otras tecnologías, como, por ejemplo la refrigeración, puede constituir una alternativa interesante para la bioconservación de una amplia variedad de alimentos entre los que se incluye el pescado fresco recién capturado.

VII.3.1. ESTRATEGIAS DE APLICACIÓN DE LAS CEPAS *Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58 DE ORIGEN MARINO PARA INCREMENTAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DEL PESCADO FRESCO RECIÉN CAPTURADO

Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos como bioconservantes para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos alterantes y patógenos presentes en diversos alimentos, y concretamente para aumentar la vida útil y la seguridad de productos derivados de la pesca (Jeppesen y Huss, 1993b; Einarsson y Lauzon, 1995; Duffes *et al.*, 1999a; Nilsson *et al.*, 1999; Katla *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2003; Brillet *et al.*, 2005; Ghalfi *et al.*, 2006; Tomé *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Tahiri *et al.*, 2009). Por consiguiente, el empleo de bacterias lácticas y/o sus metabolitos como bioconservantes alimentarios, formando parte de un sistema de barreras constituye una alternativa fácilmente aceptable por los consumidores, las agencias sanitarias y las empresas alimentarias, que permitiría obtener productos más naturales, más saludables y con menos aditivos químicos (Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Ross *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Deegan *et al.*, 2006). En este contexto, conviene destacar que el desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado y los productos de la pesca requiere la identificación de bacterias lácticas adecuadas para este fin, preferentemente procedentes de la microbiota autóctona del pescado y/o sus derivados o los ambientes marinos puesto que, presumiblemente, estarán mejor adaptadas a este tipo de hábitats y, por lo tanto, serán más competitivas que las bacterias lácticas de otros orígenes (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009). A este respecto, en este trabajo se evaluó el potencial de dos cepas multibacteriocinogénicas (*Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58, aisladas de bacalao salado y músculo de bonito, respectivamente), como bioconservantes del pescado fresco recién capturado (pescadilla y gallo), debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* y otros microorganismos alterantes del pescado como *Br. thermosphacta*, *Ps. fluorescences* y *Sh. putrefaciens* (Tablas III.5 y III.7).

De forma general, existen cuatro estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la(s) bacteriocina(s) *in situ* como cultivo protector y/o iniciador; (ii) adición de un medio fermentado por una bacteria láctica bacteriocinogénica o una cepa recombinante bacteriocinogénica como ingrediente alimentario; (iii) adición de la(s) bacteriocina(s) y/o sus mezclas

parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad como aditivo alimentario, e (iv) incorporación o inmovilización de la(s) bacteriocina(s) en el material de envasado de los alimentos con el fin de desarrollar un envase activo (Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). En este trabajo, se evaluó la eficacia de *Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58 y/o sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado fresco recién capturado durante su almacenamiento en refrigeración (0–2°C) durante 14 días, primero a escala de laboratorio y posteriormente a escala semiindustrial, realizándose en todos los casos análisis microbiológicos y una evaluación sensorial de la pescadilla y el gallo tratados con estos bioconservantes.

VII.3.1.1. Análisis microbiológicos y evaluación sensorial

A escala de laboratorio, las estrategias de aplicación de los cultivos bacteriocinogénicos y/o sus bacteriocinas consistieron en la inoculación de los diferentes lotes de pescado recién capturado con: (i) el cultivo bacteriocinogénico como cultivo protector; (ii) el sobrenadante libre de células del cultivo como ingrediente alimentario; (iii) el sobrenadante liofilizado como ingrediente alimentario liofilizado, y (iv) diversas combinaciones de estas tres estrategias (Tabla V.1 y Figs. 5.1 y 5.2). Los resultados obtenidos mostraron un patrón de reducción de la carga microbiana diferente según la forma de aplicación (Tablas V.3 y V.4). En lo que respecta a la pescadilla (*M. merluccius*), los análisis microbiológicos al final del periodo de almacenamiento en refrigeración (14 días) revelaron que cuando el pescado fresco fue inoculado con *E. faecium* BNM58 como cultivo protector (lote C) o una mezcla de *E. faecium* BNM58 y *Lb. curvatus* BCS35 como cultivos protectores (lote D), los recuentos de mesófilos y coliformes fueron más bajos que los de los otros lotes, incluyendo el lote control (lote A) (Tabla V.3). Por otra parte, los lotes tratados con el ingrediente alimentario liofilizado de *E. faecium* BNM58 (lote G) o una mezcla de éste con el ingrediente alimentario liofilizado de *Lb. curvatus* BCS35 (lote H) mostraron los menores recuentos de *St. aureus* (Tabla V.3). A su vez, los lotes en los que las bacteriocinas se aplicaron como ingrediente alimentario mediante un *spray* (lote E) (Fig. 5.1) presentaron un resultado ligeramente mejor que el lote control (lote A) a los 7 días de almacenamiento; sin embargo, los resultados empeoraron después de 14 días de almacenamiento y, por este motivo, este tipo de aplicación se descartó para el escalado semiindustrial del proceso. En cuanto a la evaluación sensorial, los análisis realizados al finalizar el periodo de almacenamiento mostraron que los lotes inoculados con *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector (lote B) o con una mezcla de éste con *E. faecium* BNM58 como cultivo protector (lote D) fueron los preferidos por los panelistas para algunos de los descriptores entre los que se incluyen la apariencia general, el limo de la piel, el color y olor de las agallas, la morfología del ojo y la textura de la carne (Fig. 5.5).

En lo que respecta al gallo (*L. boschii*), los resultados de los análisis microbiológicos mostraron que al final del periodo de almacenamiento en refrigeración (14 días), los lotes inoculados con *Lb. curvatus* BCS35 (lote B) o *E. faecium* BNM58 (lote C) como cultivos protectores, o una mezcla de ambos (lote D), y también los tratados con el sobrenadante de *Lb. curvatus* BCS35 (lote E) o de *E. faecium* BNM58 (lote F) como ingredientes alimentarios presentaron mejores resultados en los recuentos de coliformes (Tabla V.4). Los lotes tratados con algunos de los ingredientes alimentarios liofilizados (lotes H, I y J)

fueron peores que todos los demás lotes, incluyendo el lote control (lote A); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los lotes tratados y el lote control (lote A) para los recuentos de mesófilos (Tabla V.4). Los resultados del análisis sensorial al final del periodo de almacenamiento del gallo (Fig. 5.6) mostraron que los lotes inoculados con *Lb. curvatus* BCS35 (lote B) o *E. faecium* BNM58 (lote C) o la mezcla de ambos (lote D) como cultivos protectores, fueron seleccionados por los panelistas para todos los descriptores excepto la morfología del ojo y la textura de la carne.

Por otra parte, conviene destacar que se detectó *L. monocytogenes* en el lote control (lote A) a los 7 y 14 días de almacenamiento del gallo y después de 14 días de almacenamiento de la pescadilla, pero, sin embargo, no se detectó este patógeno en ninguno de los lotes de estos pescados tratados con los cultivos bacteriocinogénicos y/o sus bacteriocinas. A este respecto, trabajos previos han descrito el control de *Listeria* spp. inoculando bacterias lácticas bacteriocinogénicas o bacteriocinas semi-purificadas en salmón ahumado en frío (Duffes *et al.*, 1999a, 1999b; Katla *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Tomé *et al.*, 2008, Tahiri *et al.*, 2009). La producción de bacteriocinas y la persistencia de su actividad antimicrobiana en los alimentos es muy difícil de cuantificar, probablemente debido a sus interacciones con la matriz alimentaria o su transferencias al material de empaquetado durante el almacenamiento (Duffes *et al.*, 1999a; Vaz-Velho *et al.*, 2005). A este respecto, Richard *et al.* (2003) demostraron que el efecto inhibidor de *C. divergens* V41 (actualmente clasificada como *Carnobacterium maltaromaticum*) frente a *L. monocytogenes* en sistemas modelo de medio de salmón era debida a su capacidad para producir divercina V41, ya que cepas mutantes no bacteriocinogénicas de *C. maltaromaticum* V41 no inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes*. Por otra parte, Nilsson *et al.* (2004) llevaron a cabo un estudio en el que comprobaron la contribución de las bacteriocinas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* mediante el empleo de cepas bacteriocinogénicas de *C. piscicola* en sistemas modelo de salmón ahumado en frío. En el citado estudio, se evaluaron cepas bacteriocinogénicas de *C. piscicola* y sus mutantes no bacteriocinogénicos frente a *L. monocytogenes*, describiéndose que las bacteriocinas no eran indispensables para la reducción de este microorganismo patógeno, ya que las cepas mutantes no bacteriocinogénicas mostraron un importante efecto anti-*Listeria*. Nuestros resultados mostraron que, independientemente del método de aplicación empleado, *Listeria* spp. es inhibida en las muestras de pescadilla y gallo, mostrando así el potencial de las cepas multibacteriocinogénicas de origen marino *Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58 como cultivos protectores, así como la de sus sobrenadantes como ingredientes alimentarios, para eliminar este microorganismo patógeno del pescado fresco recién capturado.

Con base en los resultados descritos anteriormente, se seleccionó la cepa *Lb. curvatus* BCS35 para realizar el escalado semiindustrial ya que, a diferencia de *E. faecium* BNM58, posee el estatus QPS establecido por la EFSA (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007). A pesar de ello, debe mencionarse que los enterococos forman parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, y su aislamiento de alimentos, plantas, agua y suelos es muy habitual. Asimismo, algunos enterococos se emplean como cultivos iniciadores en quesos y embutidos (Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008). Además, se han aislado enterococos de diferentes medios acuáticos como aguas costeras de baño

(Arvanitidou *et al.*, 2001), aguas residuales (Valdivia *et al.*, 1996) y aguas subterráneas (Rice *et al.*, 1995; Manero y Blanch, 1999), ambientes marinos costeros (Audicana *et al.*, 1995; Quigg *et al.*, 2009) y agua de acuicultura (Cai *et al.*, 1999; Ringø *et al.*, 2005). Debido a su capacidad de tolerar altas concentraciones de sal y también por su amplio rango de temperatura de crecimiento, los enterococos pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en ambientes marinos (Harwood *et al.*, 2000; Giraffa, 2002; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ogier y Serror, 2008; Valenzuela *et al.*, 2010). Por otra parte, se han aislado enterococos bacteriocinogénicos de un amplio rango de alimentos, incluyendo productos pesqueros frescos como marisco (Wilson y McAfee, 2002; Pinto *et al.*, 2009), intestino de peces de acuicultura integrada (Petersen y Dalsgaard, 2003), intestino de carpa común y langostinos de agua dulce (Cai *et al.*, 1999); piel, agallas e intestino de trucha común, de lucio salvaje y de trucha arcoíris de acuicultura (González *et al.*, 1999), peces de agua dulce y su medio ambiente circundante (González *et al.*, 2000), músculo de rodaballo de acuicultura (Campos *et al.*, 2006), peces marinos subtropicales (Al Bulushi *et al.*, 2010) y salmón ahumado en frío, otros pescados procesados y productos de la pesca comerciales (Thapa *et al.*, 2006; Tomé *et al.*, 2008; Valenzuela *et al.*, 2010). Asimismo, en este trabajo (Capítulo III) también se encontró que cepas de *Enterococcus* spp. estaban presentes en todas las muestras de pescado excepto en el salmón marinado (Tabla III.9). El potencial de cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas frente a *L. monocytogenes* y otros patógenos alimentarios ha sido estudiado previamente (Giraffa, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003a, 2006; Valenzuela *et al.*, 2010), y se ha propuesto el empleo de diversas cepas de *E. faecium* como cultivos iniciadores o adjuntos en productos lácteos y alimentos fermentados (Casas *et al.*, 1997; Leroy *et al.*, 2003; Achemchem *et al.*, 2005; Ogier y Serror, 2008). No obstante, en la última década, los enterococos se han convertido en importantes patógenos nosocomiales y se han asociado con un gran número de infecciones humanas como infecciones del tracto urinario, endocarditis y bacteriemia (Morrison *et al.*, 1997; Hunt, 1998). Además, la creciente preocupación sobre este género está incrementada por el hecho de que algunas cepas presentan resistencias y multirresistencias a antibióticos, tanto adquiridas como transmisibles. A este respecto, conviene destacar que aunque *E. faecium* BNM58 no posee los genes de virulencia característicos del género *Enterococcus*, es sensible a los antibióticos de mayor importancia clínica y no posee actividad hemolítica, gelatinasa y proteasa (Capítulo III), esta cepa se excluyó de la segunda parte de este trabajo, el escalado semiindustrial, debido a que (i) este género no posee el estatus QPS establecido por la EFSA (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007; EFSA, 2011), y (ii) su aplicación en los alimentos es muy controvertida debido a la dificultad para lograr la aprobación de la EFSA para su empleo como bioconservantes alimentarios.

VII.3.2. BIOCONSERVACIÓN DE PESCADO FRESCO RECIÉN CAPTURADO CON *Lb. curvatus* BCS35

Los ensayos de bioconservación del pescado fresco recién capturado (pescadilla y gallo) a escala semiindustrial empleando la cepa *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector y su sobrenadante como ingrediente alimentario se llevaron a cabo en la lonja de Marín (Pontevedra), con el objetivo de conocer

la opinión profesional de un tasador oficial de pescado de esta lonja al final del periodo de almacenamiento del pescado en refrigeración (0–2°C) durante 14 días.

VII.3.2.1. Análisis microbiológicos y evaluación sensorial

Los análisis microbiológicos de la pescadilla y el gallo al final del periodo de almacenamiento (14 días) mostraron que todos los lotes tratados (lotes B, C y D) tenían recuentos bacterianos menores que el lote control (lote A) (Tabla V.5). Para la pescadilla, la mayor reducción de los recuentos de mesófilos se obtuvo en el pescado inoculado con *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector reforzado con el ingrediente alimentario liofilizado (lote C), mientras que la mayor reducción de coliformes se registró para el pescado tratado con el ingrediente alimentario de *Lb. curvatus* BCS35 (lote D). Por otra parte, para el gallo, la mayor reducción de mesófilos y coliformes se obtuvo para el pescado inoculado con *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector (lote B). Conviene destacar que *Listeria* spp. se detectó en gallo y pescadilla, pero sólo en el lote control (lote A) (Tabla V.5), al igual que se observó a escala de laboratorio, lo cual confirma la efectividad de algunas bacterias lácticas y sus bacteriocinas para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos (Duffes *et al.*, 1999a, 1999b; Katla *et al.*, 2001; Brillet *et al.*, 2005; Vaz-Velho *et al.*, 2005; Tomé *et al.*, 2008, Tahiri *et al.*, 2009). Asimismo, los resultados del tasador oficial de pescado evidenciaron el potencial de las estrategias empleadas para la bioconservación del pescado fresco puesto que tanto para la pescadilla como para el gallo, el lote control (lote A) obtuvo peores resultados que cualquiera de los lotes tratados con bioconservantes (lotes B, C y D) al final del periodo de almacenamiento (Tabla V.6). Conviene recordar que los productos que llegan al mercado en buenas condiciones de conservación alcanzan generalmente precios más altos, tanto en el comercio mayorista como en el comercio minorista, y generan, en consecuencia, un mayor rendimiento económico de la actividad pesquera. En este contexto, la pescadilla tratada con el sobrenadante de *Lb. curvatus* BCS35 como ingrediente alimentario (lote D) y el gallo tratado con *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector (lote B) fueron elegidos por el tasador oficial de pescado de la lonja como los mejores para todos los descriptores excepto el color de la carne en la pescadilla, lo cual indica que alcanzarían un mayor precio en el mercado.

En resumen, los resultados descritos demuestran el potencial de bacterias lácticas bacteriocinogénicas y de sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado fresco durante su almacenamiento en refrigeración. Conviene destacar que ésta es la primera vez que se describe la bioconservación del pescado fresco, tanto a escala de laboratorio como a escala semiindustrial, así como que la intervención de un tasador oficial de pescado en la propia lonja confirmó los resultados organolépticos obtenidos previamente en el laboratorio. A este respecto, la cepa multibacteriocinogénica de origen marino *Lb. curvatus* BCS35 aplicada como cultivo protector y/o ingrediente alimentario puede ser considerada apropiada y efectiva como bioconservante del pescado fresco; sin embargo, se requieren más estudios para optimizar la producción de sus bacteriocinas y su proceso de escalado con el fin de ofrecer a la industria pesquera una estrategia efectiva a un precio razonable como parte de una tecnología de barreras para incrementar la seguridad y calidad higiénico-sanitaria y organoléptica de estos pescados, desde el momento de su captura hasta su desembarco y posterior comercialización.

VII.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS CURVACINAS G14 Y G15 Y DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SU PRODUCCIÓN POR LA CEPA MULTIBACTERIOCINOGÉNICA SALVAJE *Lb. curvatus* BCS35 Y CEPAS RECOMBINANTES DE *Lc. lactis* MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS E INMUNOQUÍMICAS

En los últimos años, las bacteriocinas de la clase IIa (familia de la pediocina) han sido ampliamente estudiadas como aditivos alimentarios naturales, ya que poseen un amplio espectro de acción antimicrobiana y una potente actividad frente a *L. monocytogenes* y otros patógenos alimentarios como, entre otros, *B. cereus*, *Cl. botulinum* y *Cl. perfringens* (Cintas *et al.*, 1998b; Cotter *et al.*, 2005b). Asimismo, más recientemente, diversos autores han mostrado un gran interés por investigar otras aplicaciones para estos péptidos como agentes antimicrobianos en la terapéutica de enfermedades infecciosas frente a patógenos humanos de importancia, como los enterococos resistentes a vancomicina (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) o *St. aureus* resistentes a meticilina (MRSA, del inglés *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (Millette *et al.*, 2008; Sit y Vederas, 2008; Svetoch *et al.*, 2008b; Lohans y Vederas, 2012). En este contexto, la cepa multibacteriocinogénica *Lb. curvatus* BCS35 presenta una potente actividad antimicrobiana debido a la producción de, al menos, dos bacteriocinas de la clase IIa, CurG14 (una variante de SakP) y CurG15 (SakX), las cuales son sintetizadas como prepéptidos de 66 aminoácidos que contienen en una secuencia líder de 18 aminoácidos y la bacteriocina madura de 47 aminoácidos (Tabla IV.6). En este trabajo se ha evaluado *in vitro* la seguridad de esta cepa (Capítulo IV), así como su eficacia como bioconservante del pescado fresco recién capturado (pescadilla y gallo) (Capítulo V); sin embargo, para el empleo comercial de las bacteriocinas de la clase IIa es necesario un método de producción de grandes cantidades, rentable económicamente, y con un rendimiento satisfactorio del proceso de fermentación, ya que de otra forma los costes de producción serían muy elevados. En este contexto, el desarrollo de sistemas heterólogos de producción de bacteriocinas ofrece una alternativa prometedora para producir péptidos de interés en grandes cantidades (Lohans y Vederas, 2012). Por otra parte, el desarrollo de procedimientos eficientes de detección y cuantificación de las bacteriocinas en diferentes sustratos, así como en la propia matriz alimentaria, constituye otro aspecto de gran relevancia para su aplicación industrial (Criado, 2006; Sánchez *et al.* 2008; Borrero *et al.*, 2011b).

La producción funcional de las bacteriocinas por hospedadores heterólogos puede permitir: (i) incrementar la producción de las bacteriocinas; (ii) producir bacteriocinas en hospedadores más seguros; (iii) conocer la función de las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de las bacteriocinas; (iv) construir cepas productoras de varias bacteriocinas; (v) mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios, y (vi) conferir una actividad antimicrobiana mayor o más específica a las bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, protectores y/o probióticos (sección II.5) (Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006; Basanta, 2007; Sánchez, 2008). Generalmente, los sistemas de expresión heteróloga de proteínas han utilizado *E. coli* como hospedador, ya que éste es el microorganismo mejor caracterizado genéticamente y existen numerosas herramientas genéticas disponibles para su manipulación; no obstante, su empleo

para la producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas con fines alimentarios presenta limitaciones (e.g., diferencias en el código genético, toxicidad, proteólisis y dificultad de secreción) e inconvenientes (microorganismo no considerado GRAS ni QPS y potencialmente patógeno) (sección II.5) (Gutiérrez, 2005). Por el contrario, las bacterias lácticas constituyen un hospedador heterólogo adecuado, ya que, como se mencionó anteriormente, la mayoría de las especies han sido reconocidas con el estatus QPS por la EFSA (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007; EFSA, 2011). A este respecto, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, principalmente en combinación con uno de los sistemas de expresión génica más regulado, exitoso y útil para su utilización en bacterias Gram-positivas, incluidas las bacterias lácticas, denominado sistema NICE (del inglés *Nisin-Controlled Gene Expression*) (sección II.5.1) (van de Guchte *et al.*, 1992; Kuipers *et al.*, 1995; de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005), ha sido extensamente estudiado durante las últimas décadas como sistema para la producción a gran escala de proteínas homólogas y heterólogas (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Kuipers *et al.*, 1997; Kunji *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2004; Rigoulay *et al.*, 2004).

Por lo tanto, en este trabajo se procedió al desarrollo de cepas bacteriocinogénicas recombinantes de *Lc. lactis* con el objetivo de mejorar la actividad antimicrobiana y/o la producción de las bacteriocinas CurG14 y CurG15 de *Lb. curvatus* BCS35, así como de optimizar su producción por la cepa salvaje y desarrollar un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de la producción de estas bacteriocinas.

VII.4.1. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE *Lc. lactis* PRODUCTORAS DE CurG14 y CurG15

La producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos puede basarse en: (i) la expresión de genes nativos; (ii) el intercambio de la secuencia líder o el péptido señal (SP, del inglés *Signal Peptide*) y/o el sistema de transporte y procesamiento de unas bacteriocinas con el de otras, o (iii) la fusión de la bacteriocina madura a SP que actúen como señales de transporte y procesamiento a través de la Ruta General de Secreción o sistema Sec (Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). A este respecto, el empleo de quimeras construidas mediante la fusión de un SP a la bacteriocina madura para dirigir su secreción por *Lc. lactis*, en ausencia de proteínas de transporte y de inmunidad específicas, ha sido descrito previamente (Worobo *et al.*, 1995; Nouaille *et al.*, 2003; Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). De forma similar, en este trabajo se procedió a sustituir la secuencia líder del tipo doble glicina de las bacteriocinas CurG14 y CurG15, producidas por *Lb. curvatus* BCS35, por el SP de la proteína Sec-dependiente Usp45 (SP_{usp45}), que constituye la principal proteína secretada por *Lc. lactis*, permitiendo así la producción de CurG14 y CurG15 por *Lc. lactis* NZ9000. Para ello, quimeras génicas formadas por un fragmento del gen que codifica el SP_{usp45} fusionado al gen estructural de CurG14 (*sppA*), con o sin su gen de inmunidad (*sppiA*), y al de CurG15 (*sakX*), con o sin su gen de inmunidad (*sakI_x*), se clonaron en el vector de expresión pNZ8048 bajo el control del promotor inducible P_{nisA}, generando los plásmidos recombinantes pNUG14E (SP_{usp45}:*sppA*), pNUG15E (SP_{usp45}:*sakX*), pNUG14EI (SP_{usp45}:*sppiA*) y

pNUG15EI (SP_{usp45::sakI_x}) (Fig. 6.1). Posteriormente, estos plásmidos se emplearon para transformar células competentes de *Lc. lactis* NZ9000, generándose de este modo cepas recombinantes de *Lc. lactis* NZ9000 con la capacidad de producir y secretar CurG14 y CurG15 biológicamente activas al medio extracelular.

Los resultados obtenidos demostraron que el empleo de estas quimeras génicas permite una mayor producción de estas bacteriocinas en *Lc. lactis* NZ9000, incluso en ausencia de la proteína de inmunidad específica y de proteínas de transporte dedicado. Por lo tanto, el mínimo requerimiento para la producción de CurG14 y CurG15 biológicamente activas en *Lc. lactis* son los genes *sppA* y *sakX*, respectivamente, como se ha demostrado anteriormente para otras bacteriocinas que, teniendo un sistema de procesado y secreción dedicado, pueden también acceder a la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec si están dotadas de un SP adecuado (McCormick *et al.*, 1996; Biet *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2005a, 2005b, 2006; Sánchez *et al.*, 2008; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b).

VII.4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE CurG14 y CurG15 PRODUCIDAS POR CEPAS RECOMBINANTES DE *Lc. lactis* NZ9000 Y LA CEPA MULTIBACTERIOCINOGENICA SALVAJE *Lb. curvatus* BCS35

La obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a CurG14 y CurG15 permitió la detección y cuantificación de estas bacteriocinas, mediante un ensayo ELISA-NCI en combinación con las técnicas microbiológicas TDA y MPA, en los sobrenadantes de las células recombinantes de *Lc. lactis* NZ9000. Las máximas concentraciones de CurG14 (4,9 µg/ml) y CurG15 (17,2 µg/ml) (Tabla VII.3) producidas por las cepas recombinantes de *Lc. lactis* NZ9000 representaron, aproximadamente, un incremento de 25 y 4 veces, respectivamente, con respecto a las cuantificadas en los sobrenadantes de la cepa salvaje *Lb. curvatus* BCS35 (0,2 y 4,4 µg/ml de CurG14 y CurG15, respectivamente) (Tabla VII.3). Este resultado es muy prometedor ya que el uso de diferentes hospedadores y sistemas de expresión para la producción heteróloga de bacteriocinas de la clase IIa ha resultado a menudo en la obtención de cantidades menores que las producidas por las cepas bacteriocinogénicas salvajes (Marugg *et al.*, 1992; Chikindas *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000b; Martín *et al.*, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b). A este respecto, entre los factores más importantes que influyen en la producción de bacteriocinas se incluyen el tamaño del vector de expresión y su estabilidad y número de copias, así como el tipo y naturaleza del promotor empleado para dirigir la expresión génica (Borrero *et al.*, 2011b). En este contexto, los sistemas inducibles se consideran a menudo más eficientes que los sistemas de expresión constitutivos ya que aquéllos permiten obtener una biomasa suficiente antes de que se inicie la expresión de los genes que codifican las proteínas de interés (Kim y Mills, 2007; Borrero *et al.*, 2011b). Asimismo, el corto periodo de inducción requerido para la producción óptima de las bacteriocinas empleando el sistema NICE previene probablemente que la bacteriocina se adhiera a la membrana celular, forme agregados y/o se degrade debido a la acción de las proteasas microbianas (Gutiérrez *et al.*, 2006). A este respecto los resultados obtenidos muestran que una inducción adecuada de la expresión génica a una DO₆₀₀ de 0,5 y un posterior crecimiento de la cepa

recombinante durante 3 h es la combinación más adecuada para obtener la máxima producción de CurG14 y CurG15 (Tabla VII.3).

Tabla VII.3. Detección y cuantificación de la producción de CurG14 y CurG15 por cepas recombinantes de *Lc. Lactis* NZ9000 y la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lb. curvatus* BCS35 mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas.

Cepa productora				Detección y cuantificación						
Recombinantes	DO ₆₀₀ ^a	Tiempo (h) ^b	CurG14			CurG15				
			TDA	MPA	ELISA-NCI	TDA	MPA	ELISA-NCI		
			(mm) ^c	(UB/ml) ^d	(ng/ml) ^e	(mm) ^c	(UB/ml) ^d	(ng/ml) ^e		
<i>Lc. lactis</i> NZ9000-69E (pNUG14E)	0,3	1,5	8,3 s2	320	654	-	-	-		
		3	9,6 s2	440	898	-	-	-		
		5	9,0 s2	400	817	-	-	-		
	0,5	1,5	11,4 s2	1.245	2.554	-	-	-		
		3	13,0 s2	2.530	4.896	-	-	-		
		5	12,8 s2	2.200	4.433	-	-	-		
	0,9	1,5	10,0 s2	659	1.302	-	-	-		
		3	9,8 s2	480	972	-	-	-		
		5	7,3 s2	-	387	-	-	-		
<i>Lc. lactis</i> NZ9000-12E (pNUG15E)	0,3	1,5	-	-	-	22,0 s2	19.976	14.987		
		3	-	-	-	22,9 s2	20.785	15.643		
		5	-	-	-	23,4 s2	21.580	16.243		
	0,5	1,5	-	-	-	23,5 s2	21.654	16.389		
		3	-	-	-	23,9 s2	22.843	17.149		
		5	-	-	-	23,6 s2	22.170	16.721		
	0,9	1,5	-	-	-	6,3 s	-	174		
		3	-	-	-	11,7 s	403	324		
		5	-	-	-	10,0 s	385	198		
Salvaje	DO ^f		T ^a (°C) ^g	TDA (mm) ^h	MPA		CurG14		CurG15	
	DO ₆₀₀	t (h)			(UB/ml) ⁱ	t (h)	ELISA-NCI (ng/ml) ^j	t (h)	ELISA-NCI (ng/ml) ^j	t (h)
	<i>Lb. curvatus</i> BCS35	1,10	60	37	Nd	130	30	86	60	3.181
1,13		60	30	Nd	224	20	243	22	1.223	37
1,14		114	25	Nd	207	20	188	18	564	20
1,02		186	18	Nd	236	58	107	37	4.356	37
0,98		542	8	Nd	202	379	8	138	13	111
0,74		542	4	Nd	104	327	6	327	11	138

^aDensidad óptica (DO₆₀₀) de inducción de la expresión génica de las células recombinantes. ^bTiempo (h) de crecimiento tras la inducción de la expresión génica de las células recombinantes. ^cActividad antimicrobiana (mm) determinada mediante TDA empleando *L. monocytogenes* CECT936 como microorganismo indicador. Las halos de inhibición se diferencian como: s=nítido y s2=muy nítido. ^dActividad antimicrobiana (UB/ml) determinada mediante MPA empleando *L. monocytogenes* CECT936. ^eConcentración (ng/ml) de las bacteriocinas determinada mediante ELISA-NCI empleando anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a CurG14 y CurG15. ^fMáxima DO₆₀₀ alcanzada por la cepa salvaje a cada temperatura y tiempo (t) en horas (h) necesario para alcanzar la máxima DO₆₀₀. ^gTemperatura (°C) de crecimiento de la cepa salvaje. ^hNd, no determinado. ⁱActividad antimicrobiana (UB/ml) determinada mediante MPA empleando *P. pentosaceus* FBB63 y tiempo (t) en horas (h) de crecimiento en el que se alcanza la máxima actividad antimicrobiana. ^jConcentración (ng/ml) de las bacteriocinas determinada mediante ELISA-NCI empleando anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a CurG14 y CurG15 y tiempo (t) en horas (h) de crecimiento en el que se alcanza la máxima concentración de cada bacteriocina.

Por otra parte, la utilización de ensayos inmunoquímicos ELISA-NCI empleando los anticuerpos obtenidos, en combinación con el ensayo microbiológico MPA, permitió determinar el efecto de la temperatura (4–37°C) en la producción de bacteriocinas por *Lb. curvatus* BCS35 (Tabla VII.3). De forma general, la producción de bacteriocinas por la mayoría de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas salvajes es un fenómeno asociado al crecimiento que muestra una cinética similar a la de los metabolitos primarios (de Vuyst y Vandamme, 1994b; Franz *et al.*, 1996; Leroy y de Vuyst, 1999, 2002; Messens *et al.*, 2003; Criado, 2006). A este respecto, la cinética de producción de CurG14 y CurG15 por *Lb. curvatus* BCS35 es similar a la de los metabolitos primarios, ya que su producción se inicia al comienzo de la fase exponencial de crecimiento, alcanzándose las máximas concentraciones al final de esta fase (Fig. 6.4), tal y como se ha descrito para la mayoría de las bacteriocinas (Parente y Hill, 1992; Franz *et al.*, 1996; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Diep y Nes, 2002; Herranz *et al.*, 2001c; Criado, 2006; Criado *et al.*, 2006b); no obstante, a 37°C, la máxima concentración se detectó al final de la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 6.4). Conviene destacar que, en algunos casos, se ha descrito que la temperatura influye en la producción de bacteriocinas de manera independiente al crecimiento, ya que el desarrollo a temperaturas subóptimas también puede estar asociado a incrementos en la producción de las bacteriocinas (Parente y Hill, 1992; Franz *et al.*, 1996; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Diep y Nes, 2002; Herranz *et al.*, 2001c; Criado, 2006; Criado *et al.*, 2006b). A este respecto, la producción de CurG14 y CurG15 por *Lb. curvatus* BCS35 es un proceso dependiente de la temperatura en el que este parámetro influye considerablemente en la producción de los dos péptidos antimicrobianos, a pesar de que ejerce una escasa influencia en el crecimiento y, por lo tanto, en la biomasa final de la cepa productora (Fig. 6.4). En este sentido, la máxima producción de CurG14 y CurG15 por *Lb. curvatus* BCS35 se detectó en los cultivos desarrollados en caldo MRS a 30 y 18°C, respectivamente (Tabla VII.3).

De forma similar a lo observado para CurG15, para la que la temperatura óptima de producción no es la temperatura óptima de crecimiento de la cepa productora, la producción de CurA (Vogel *et al.*, 1993b; Messens *et al.*, 2003), sakacina K (Møretrø *et al.*, 2000), SakA (Diep *et al.*, 2000), SakP (Aasen *et al.*, 2000), lacticina RM, una bacteriocina producida por *Lactobacillus pentosus* B96 (Delgado *et al.*, 2005), mesentericina 52A (Krier *et al.*, 1998), amylovorina L471 (de Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998) y enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) (Criado *et al.*, 2006b) está estimulada por temperaturas subóptimas para el crecimiento de la correspondiente cepa bacteriocinogénica. A este respecto, la producción óptima de bacteriocinas a temperaturas subóptimas de crecimiento puede deberse a los siguientes factores: (i) menor degradación/inactivación de la bacteriocina; (ii) menor tasa de reacciones enzimáticas, lo que origina una tasa de crecimiento reducida y unos niveles elevados de los metabolitos esenciales para la síntesis de bacteriocina; (iii) menor tasa de adsorción de la bacteriocina a las células productoras; (iv) mayor expresión génica a nivel de la transcripción y/o traducción, y/o (v) mayor producción del péptido inductor (Leroy y de Vuyst, 1999; Aasen *et al.*, 2000; Diep *et al.*, 2000; Møretrø *et al.*, 2000; Keren *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b). Asimismo, conviene destacar que la considerable influencia de la temperatura de crecimiento en la producción de bacteriocinas descrita en este trabajo no parece estar correlacionada con su moderado efecto en la obtención de biomasa celular. Así, por ejemplo, la cantidad de bacteriocina producida por *Lb. curvatus* BCS35 cuando se había alcanzado una DO₆₀₀ de

aproximadamente 0,7 fue mucho más baja a 8 y 4°C que a 37, 30, 25 y 18°C (Tabla VII.3); por lo tanto, la temperatura probablemente ejerza una influencia en la producción de CurG14 y CurG15 por esta cepa no relacionada directamente con el crecimiento, a diferencia de lo que han sugerido previamente otros autores (Lejeune *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999; Leroy y de Vuyst, 2002).

En lo que respecta a la relación entre la concentración de bacteriocina y su actividad antimicrobiana, resulta relevante mencionar que la mayor actividad antimicrobiana de *Lb. curvatus* BCS35 a 18°C podría atribuirse a la mayor producción de CurG15 a esta temperatura (Fig. 6.4 y Tabla VI.8); sin embargo, la relativamente elevada actividad antimicrobiana detectada a 8°C no parece estar relacionada con las pequeñas cantidades de CurG14 y CurG15 detectadas a esta temperatura (Fig. 6.4 y Tabla VI.8), siendo posible que este fenómeno esté relacionado con la producción de otras bacteriocinas como SakQ y/o SakT, cuyos genes estructurales están presentes en el genoma de *Lb. curvatus* BCS35 (Capítulo IV). Por otra parte, la máxima actividad antimicrobiana detectada tras 33 h de crecimiento a 37°C no está en concordancia con la máxima producción de CurG14 y CurG15 detectada al final de la fase estacionaria (60 y 55 h, respectivamente) (Fig. 6.4 y Tabla VI.8). En este contexto, es interesante destacar que la máxima producción de CurG14 y CurG15 por *Lb. curvatus* BCS35 tiene lugar a diferentes temperatura óptimas (30 y 18°C, respectivamente) (Tabla VII.3) de forma similar a lo descrito previamente para las mesenterocinas 52A y 52B, producidas por *Le. mesenteroides* FR52 (Krier *et al.*, 1998), cuya producción es máxima a 20 y 25°C, respectivamente, así como para la EntL50 (EntL50A y EntL50B), EntP y enterocina Q (EntQ), producidas por *E. faecium* L50, cuya mayor producción tiene lugar a 25, 37 y 47°C, respectivamente (Criado *et al.*, 2006b). A este respecto, el hecho de que la temperatura de crecimiento pueda favorecer la producción de una bacteriocina en particular permite argumentar que sería factible manipular la proporción de las distintas bacteriocinas producidas por una cepa multibacteriocinogénica mediante el control de su temperatura de incubación (Parente y Ricciardi, 1999), lo que podría tener una gran importancia en el caso de que exista un efecto sinérgico entre estas bacteriocinas, ya que su presencia en una proporción óptima permitiría obtener un incremento de su actividad antimicrobiana total (Krier *et al.*, 1998).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que existe una diferencia significativa en la producción máxima de CurG14 (0,2 µg/ml) y CurG15 (4,4 µg/ml) por *Lb. curvatus* BCS35 (Tabla VII.3). A este respecto, conviene destacar que los reducidos niveles de producción de CurG14 son comparables a los obtenidos para EntL50 (EntL50A [0,2 µg/ml] y EntL50B [0,2 µg/ml]) producida por *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006); sin embargo, los de CurG15 son similares a los descritos para otras bacteriocinas producidas por otras bacterias lácticas, tales como EntA (2,5 µg/ml) producida por *E. faecium* T136 (Martínez *et al.*, 1999), PedPA-1 (1,9 µg/ml) de *P. acidilactici* 347 (Martínez *et al.*, 1999), SakP (0,5-1 µg/ml) de *Lb. sakei* CCUG 42687 (Aasen *et al.*, 2000) y EntQ (3,7 µg/ml) y EntP (8,1 µg/ml) producidas por *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b). Por otra parte, distintos estudios han demostrado que una bacteriocina puede ser producida a distintas concentraciones por distintos géneros, especies e incluso cepas (Yang y Ray, 1994; Horn *et al.*, 1998, 1999; Martínez *et al.*, 1999; Parente y Ricciardi, 1999; Martínez *et al.*, 2000b; Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b) y han sugerido que estas diferencias pueden explicarse como consecuencia de: (i) el número de copias de

los genes estructurales de las bacteriocinas; (ii) los niveles de transcripción/traducción; (iii) la actividad específica de las enzimas de procesamiento cuando son requeridas; (iv) el nivel de resistencia a la bacteriocina, y/o (v) la menor producción de bacteriocinas por cepas productoras de múltiples bacteriocinas (Horn *et al.*, 1998, 1999; Parente y Ricciardi, 1999; Abriouel *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado, 2006).

Finalmente, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que la obtención y el empleo de anticuerpos policlonales es una estrategia apropiada para la caracterización de la producción de bacteriocinas, tanto por la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lb. curvatus* BCS35 como por las cepas recombinantes de *Lc. lactis* NZ9000. En este contexto, nuestros resultados demuestran un alto nivel de producción de CurG14 y CurG15 biológicamente activas por las cepas recombinantes empleando quimeras que codifican el SP de la proteína Usp45 unido a la bacteriocina madura, lo que permitió incrementar la producción de estas bacteriocinas 20 y 4 veces, respectivamente, con respecto a la cuantificada en la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lb. curvatus* BCS35. Por lo tanto, el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas puede contribuir a solucionar los problemas identificados a menudo para sus aplicaciones en la bioconservación de alimentos y en medicina humana y veterinaria, entre los que destacan su alto coste de producción, su baja adaptación al ambiente alimentario, sus bajos rendimientos y su inestabilidad genética. No obstante, el empleo de organismos modificados genéticamente en la industria alimentaria requiere una evaluación exhaustiva de su seguridad para la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente, así como una adecuada formación e información al consumidor que permitan lograr una mayor aceptación de esta prometedora estrategia de producción de péptidos y proteínas de relevancia para las industrias alimentaria y farmacéutica y para la Salud Pública.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

PRIMERA. El pescado, el marisco y los productos de la pesca constituyen una fuente adecuada para el aislamiento de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana. De 1.245 bacterias lácticas de origen marino evaluadas en este trabajo, aisladas de 16 muestras de pescado, marisco y productos de la pesca, se identificaron 197 cepas con actividad antimicrobiana directa, lo que representa un 15,8%; de éstas, 158 cepas, lo que representa un 12,7% del total, inhibieron el desarrollo de, al menos, una de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas. De las 64 bacterias lácticas seleccionadas, 25 cepas, lo que representa un 39,1%, mostraron actividad antimicrobiana extracelular debida a la producción de bacteriocinas termoestables con espectros de acción heterogéneos.

SEGUNDA. Las 64 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas se clasificaron taxonómicamente como *Enterococcus faecium* (24 cepas; 37,5%), *Enterococcus faecalis* (22 cepas; 34,4%), *Pediococcus pentosaceus* (7 cepas; 10,9%), *Weissella cibaria* (5 cepas; 7,8%), *Lactobacillus sakei* (4 cepas; 6,3%), *Lactobacillus curvatus* (1 cepa; 1,6%) y *Leuconostoc mesenteroides* (1 cepa; 1,6%). Las 25 cepas bacteriocinogénicas se identificaron como *Enterococcus faecium* (20 cepas), *Lactobacillus sakei* (3 cepas), *Lactobacillus curvatus* (1 cepa) y *Pediococcus pentosaceus* (1 cepa).

TERCERA. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió determinar la presencia de los genes estructurales de enterocinas caracterizadas previamente en 18 de las 20 cepas bacteriocinogénicas de *Enterococcus faecium*, y los genes estructurales más extendidos, tanto solos como en combinación, fueron los que codifican la enterocina L50 (L50A y L50B) y la enterocina P, detectándose en un 65 y 60% de las cepas de *Enterococcus faecium*, respectivamente.

CUARTA. La cepa *Lactobacillus curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado (*Gadus morhua*), puede considerarse una cepa segura y posee un amplio y potente espectro de acción antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, especialmente *Listeria monocytogenes*, debido a la producción de, al menos, dos bacteriocinas de la clase IIa: (i) curvacina G14, una variante de la sakacina P que contiene un residuo de tirosina en vez de histidina en posición 12 de la bacteriocina madura, y (ii) curvacina G15, una bacteriocina idéntica a la sakacina X. Además, en el genoma de *Lactobacillus curvatus* BCS35 se identificaron también los genes estructurales que codifican la sakacina T (SakT_α y SakT_β) y la sakacina Q.

QUINTA. En este trabajo se describe por primera vez la eficacia del empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado fresco, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus bosci*), durante su almacenamiento en refrigeración durante 14 días. Los análisis microbiológicos realizados en los lotes de pescado bioconservados con la cepa multibacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* BCS35 como cultivo protector y/o ingrediente alimentario mostraron recuentos menores que los de los lotes control. Asimismo, el análisis sensorial realizado por un experto tasador oficial de la lonja gallega de Marín permitió concluir que los lotes bioconservados alcanzarían un precio más alto en el mercado que los respectivos lotes control.

SEXTA. La inmunización de conejos con péptidos sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica de las curvacinas G14 y G15, conjugados a la molécula portadora KLH, posibilitó la obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada y elevada sensibilidad frente a estas bacteriocinas, lo que también permitió, mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA, detectar y cuantificar su presencia en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lactobacillus curvatus* BCS35 y de las cepas recombinantes bacteriocinogénicas de *Lactococcus lactis* NZ9000 generadas en este trabajo.

SÉPTIMA. La temperatura de incubación influye en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus curvatus* BCS35, detectándose la máxima producción de las curvacinas G14 y G15 en los cultivos desarrollados en caldo MRS a 30 y 18°C, respectivamente.

OCTAVA. La clonación de quimeras génicas que codifican el péptido señal de la proteína Usp45 fusionado a las bacteriocinas curvacina G14 y G15 maduras en el plásmido pNZ8048 bajo el control del promotor inducible de la nisina A, así como la transformación por electroporación de los vectores resultantes en *Lactococcus lactis* NZ9000, permitió la producción de curvacinas G14 y G15 biológicamente activas. La producción de las curvacinas G14 y G15 por las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* NZ9000 fue 20 y 4 veces superior, respectivamente, a la cuantificada para la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lactobacillus curvatus* BCS35, lo que demuestra la eficacia de la estrategia genética y de las cepas recombinantes desarrolladas en este trabajo para la producción heteróloga de estas bacteriocinas.

CHAPTER VIII

CONCLUSIONS

FIRST. Fish, seafood and fish products constitute a suitable source for the isolation of Lactic Acid Bacteria with antimicrobial activity. From 1,245 Lactic Acid Bacteria evaluated in this work, isolated from 16 samples of fish, seafood and fish products, 197 strains showed direct antimicrobial activity, which represent a 15.8%; from these, 158 strains, which represent a 12.7% of the total Lactic Acid Bacteria, inhibited the growth of, at least, one of the tested *Listeria monocytogenes* strains. From the 64 selected Lactic Acid Bacteria, 25 strains, which represent a 39.1%, showed extracellular antimicrobial activity due to the production of heat-stable bacteriocins with heterogeneous inhibitory spectra.

SECOND. The 64 selected Lactic Acid Bacteria with antimicrobial activity were taxonomically identified as *Enterococcus faecium* (24 strains; 37.5%), *Enterococcus faecalis* (22 strains; 34.4%), *Pediococcus pentosaceus* (7 strains; 10.9%), *Weissella cibaria* (5 strains; 7.8%), *Lactobacillus sakei* (4 strains; 6.3%), *Lactobacillus curvatus* (1 strain; 1.6%) and *Leuconostoc mesenteroides* (1 strain; 1.6%). The 25 bacteriocinogenic strains were identified as *Enterococcus faecium* (20 strains), *Lactobacillus sakei* (3 strains), *Lactobacillus curvatus* (1 strain) and *Pediococcus pentosaceus* (1 strain).

THIRD. The polymerase chain reaction (PCR) allowed the detection of previously described enterocin structural genes in 18 out of the 20 bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains, with those encoding enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin B being the most prevalent (65 and 60%, respectively), either alone or in combination with other enterocin structural genes.

FOURTH. The strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*), may be considered a safe strain that displays a broad and strong antimicrobial activity spectrum against spoilage and food-borne pathogenic microorganisms of concern for the food industry, mainly *Listeria monocytogenes*, due to the production of, at least, two class IIa bacteriocins: (i) curvacin G14, a sakacin P variant containing a tyrosine residue instead of histidine residue at position 12 of the mature bacteriocin, and (ii) curvacin G15, a bacteriocin identical to sakacin X. Moreover, the genes encoding the bacteriocins sakacin T (SakT α and SakT β) and sakacin Q were also detected in the genome of *Lactobacillus curvatus* BCS35.

FIFTH. This work describes for the first time the efficiency of the use of bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and/or their bacteriocins as biopreservatives for fresh fish, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*), during their refrigerated storage for 14 days. Microbiological analyses of fish batches biopreserved with the multibacteriocinogenic strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, as protective culture and/or food ingredient, showed lower counts than those of the control batches. Besides, the sensorial evaluation carried out by an official fish appraiser from the Galician Marín retail fish market allowed to conclude that biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than their respective control batches.

SIXTH. Immunization of rabbits with chemically synthesized peptides derived from the amino acid sequence of curvacins G14 and G15, conjugated to the carrier protein KLH, permitted the generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity and suitable sensitivity against these bacteriocins,

which also allowed, by using ELISA immunoenzymatic assays, their detection and quantification in culture supernatants from the multibacteriocinogenic wild-type strain *Lactobacillus curvatus* BCS35 and the *Lactococcus lactis* NZ9000 bacteriocinogenic recombinant strains.

SEVENTH. Growth temperature influences bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* BCS35, being curvacin G14 and G15 maximally produced by cultures grown in MRS broth at 30 and 18°C, respectively.

EIGHTH. The use of genetic chimeras encoding the signal peptide of Usp45 fused to the mature curvacins G14 and G15 into the expression vector pNZ8048 under control of the inducible nisin A promoter, and the transformation by electroporation of the resulting plasmids in *Lactococcus lactis* NZ9000 cells, permitted the production of biologically active curvacins G14 and G15. The production of curvacins G14 and G15 by the recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 strains was 20- and 4-fold higher, respectively, than the production quantified for the multibacteriocinogenic wild-type strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, which demonstrates the efficiency of the genetic strategy and the recombinant strains developed in this work for the heterologous expression of these bacteriocins.

CAPÍTULO IX

TRABAJO FUTURO

En los últimos años se ha propuesto la utilización de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos, formando parte de un sistema de barreras, como una alternativa al empleo de aditivos químicos que sería fácilmente aceptada por los consumidores, los Organismos sanitarios y las industrias alimentarias, y que, además, satisfaría la creciente demanda de alimentos más naturales y saludables, mínimamente procesados y con una mayor calidad higiénico-sanitaria y seguridad. Asimismo, dado que las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana y/o bacteriocinogénica poseen el potencial de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos responsables de ocasionar infecciones en humanos y animales, y de reducir la productividad animal, se ha sugerido también su utilización como cultivos probióticos para humanos y animales de explotación, como estrategia de biocontrol que permita la reducción del empleo de antibióticos en medicina humana y veterinaria. En este contexto, la EFSA ha elaborado y publicado recientemente una lista de microorganismos con estatus QPS (del inglés, *Qualified Presumption of Safety*) en la que se incluyen la mayoría de las especies de bacterias lácticas asociadas tradicionalmente a los alimentos y la producción animal (EFSA, 2007; EFSA, 2008a; EFSA, 2011), proporcionando así un sistema genérico de asesoramiento de la seguridad de los microorganismos introducidos deliberadamente en la cadena alimentaria, desde los piensos para animales hasta el consumidor final. A este respecto, el estatus QPS se establece con base en los siguientes cuatro pilares generales: (i) establecimiento de la identidad taxonómica; (ii) cuerpo de conocimiento; (iii) posible patogenicidad, y (iv) empleo final, de forma que cualquier microorganismo cuya identidad se pueda determinar inequívocamente y se garantice su pertenencia a un grupo QPS se pueda aplicar en la producción de alimentos y/o como probiótico para humanos o animales con el único requerimiento de demostrar la ausencia de determinantes genéticos transmisibles que confieran resistencia a antibióticos de relevancia clínica en medicina humana y veterinaria.

Como se ha descrito en esta memoria, en este trabajo de investigación se procedió al aislamiento e identificación de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana y/o bacteriocinogénica de diversos sustratos alimentarios de origen marino (pescados, mariscos y productos de la pesca) y, en primer lugar, se evaluó su eficacia para inhibir el desarrollo de diversos microorganismos alterantes y patógenos de interés para la industria alimentaria, en general, y la industria pesquera, en particular. Posteriormente, se procedió a la caracterización bioquímica y genética de las curvacinas G14 y G15 (CurG14 y CurG15, respectivamente) producidas por la cepa multibacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado, así como a la evaluación *in vitro* de su seguridad, a la aplicación de esta cepa y/o sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado fresco recién capturado, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus boscii*), y a la producción heteróloga de CurG14 y CurG15 por cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Como continuación del trabajo investigador realizado en esta Tesis Doctoral se propone el desarrollo de dos líneas de investigación futuras, basadas en los resultados obtenidos en este trabajo y en la colección de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de origen marino aisladas y, en algunos casos, caracterizadas bioquímica y genéticamente: (i) optimización y aplicación *in situ* en los barcos de pesca de las estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado empleando bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas, y (ii) caracterización y

evaluación de la colección de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de origen marino y evaluación de su eficacia como cultivos probióticos para el desarrollo de una acuicultura sostenible.

En lo que respecta a la línea de investigación referente a la bioconservación del pescado fresco, conviene destacar que en este trabajo se describe por primera vez la eficacia del empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas y sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado durante su almacenamiento en refrigeración. A este respecto, los análisis microbiológicos realizados en los lotes de pescado bioconservados durante 14 días con la cepa multibacteriocinogénica *Lb. curvatus* BCS35 como cultivo protector y/o ingrediente alimentario mostraron recuentos menores que los de los lotes control. Asimismo, el análisis sensorial realizado por un experto tasador oficial de la lonja de Marín (Pontevedra, Galicia, España) permitió concluir que los lotes bioconservados alcanzarían un precio más alto en el mercado que los respectivos lotes control. Con base en estos resultados, se propone como trabajo futuro la evaluación de la eficacia de una estrategia de bioconservación del pescado fresco durante una marea de 14 días a bordo de un barco de altura, lo que requerirá el desarrollo de los siguientes objetivos: (i) optimización a escala semiindustrial de la producción de biomasa celular y bacteriocinas por, entre otras, la cepa multibacteriocinogénica *Lb. curvatus* BCS35, lo que requerirá su desarrollo en fermentadores bajo condiciones ambientales controladas (*e.g.*, pH, aireación y composición del medio de cultivo); (ii) optimización de las condiciones de mantenimiento de los cultivos y/o los correspondientes sobrenadantes libres de células durante el tiempo de duración de la marea, lo que requerirá la formulación y el desarrollo de un medio de conservación rentable económicamente y que mantenga la viabilidad de los cultivos y/o la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes, y, por último, (iii) optimización de las condiciones de aplicación de esta estrategia de bioconservación del pescado en las bodegas de los barcos de altura con el objetivo de que resulte de fácil aplicación y no ralentice los tiempos requeridos para el procesamiento del pescado a bordo.

Por otra parte, en lo que respecta a la línea de investigación sobre el desarrollo de cultivos probióticos para su aplicación en la acuicultura, conviene destacar que, en la actualidad, la prevención y el control de las enfermedades de los peces, especialmente las de etiología bacteriana que se presentan durante las etapas larvaria y de alevinaje, representan uno de los principales retos ante los que debe enfrentarse la moderna acuicultura, tanto continental como marina. En este contexto, tradicionalmente se han empleado antibióticos (en muchas ocasiones de forma indiscriminada) como agentes terapéuticos y, en muchos casos, en los tratamientos profilácticos de las ictiopatologías de etiología bacteriana, tanto mediante su adición directa a los piensos como por inyección o inmersión de los peces en soluciones antibióticas; no obstante, a pesar de la indudable eficacia de la quimioterapia para la prevención y el tratamiento de las enfermedades de los peces, cada vez existe una mayor reticencia a su empleo, no sólo por parte de las Agencias sanitarias sino también por las propias piscifactorías y los consumidores, debido a sus posibles efectos perjudiciales para la salud animal y humana, la seguridad alimentaria y el medio ambiente. Entre estos efectos adversos pueden destacarse los siguientes: (i) aparición y transferencia de (multi)resistencias a antibióticos en la microbiota patógena de los peces, lo que conlleva un alto riesgo de incremento del número de epizootias; (ii) diseminación de estas resistencias al medio ambiente y a otros microorganismos, tanto bacterias patógenas del hombre, los peces y otros animales

como bacterias saprófitas, que, a su vez, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos, los cuales, mediante transferencia horizontal (*e.g.*, mediada por transposones o plásmidos como IncP1), pueden ser adquiridos por bacterias productoras de enfermedades; (iii) presencia de residuos de antibióticos en los alimentos, que pueden provocar efectos toxicológicos, reacciones alérgicas y disbiosis intestinales en los consumidores y manipuladores de los peces y pescados, y (iv) acumulación de residuos de antibióticos procedentes de los piensos no ingeridos y las heces de los peces en el sedimento marino, lo que puede ejercer una presión selectiva que provoca la modificación de la microbiota y la selección de bacterias resistentes a estas sustancias antimicrobianas (Hernández, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008c). A este respecto, diversos estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado, por ejemplo, la transferencia de resistencias antibióticas desde bacterias patógenas de peces (*e.g.*, *Aeromonas salmonicida* y *Listonella anguillarum*) a especies patógenas para el hombre de gran relevancia, como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas hydrophila* (Cabello, 2006; Defoirdt *et al.*, 2011). Por todo ello, en la UE, EE.UU., Canadá, Japón y la mayoría de los países industrializados se han desarrollado regulaciones cada vez más restrictivas sobre el empleo de antibióticos en acuicultura, que incluyen, por ejemplo, la prohibición de su empleo como tratamiento profiláctico, la restricción del número de antibióticos autorizados, el control de su prescripción veterinaria, el establecimiento y vigilancia de límites máximos de residuos (LMR) y la prohibición expresa del empleo de determinados antibióticos por su elevada toxicidad o por su importancia en medicina humana y su capacidad para generar resistencias (Hernández, 2005; EFSA, 2008b, 2008c).

Considerando lo expuesto anteriormente, la moderna acuicultura debe realizar un uso responsable de los antibióticos, en el contexto de unas Prácticas Acuícolas Correctas (GAP, del inglés *Good Aquaculture Practices*), que incluyan unas prácticas correctas de higiene, medidas de bioseguridad apropiadas, vigilancia epidemiológica constante de las ictiopatologías, nutrición óptima de los peces y utilización de otras estrategias preventivas, como, por ejemplo, la vacunación (principalmente basada en el empleo de bacterinas o vacunas bacterianas inactivadas, que son aplicadas mediante inyección intraperitoneal, inmersión o, aunque de forma menos efectiva, oralmente) (EFSA, 2008b; Almeida *et al.*, 2009; Toranzo *et al.*, 2009; Plant y LaPatra, 2011). A este respecto, aunque la vacunación constituye, en principio, el método ideal para la prevención de las ictiopatologías de etiología bacteriana, su aplicación en acuicultura resulta dificultada por, entre otras, las siguientes circunstancias: (i) el limitado número de vacunas comerciales efectivas en el mercado; así, por ejemplo, existen vacunas (con efectividad variable) frente a *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Renibacterium salmoninarum*, *Photobacterium damsela*, *Yersinia ruckeri*, *Tenacibaculum maritimum*, *Vibrio anguillarum* o *Vibrio salmonicida*, pero no se dispone de vacunas, o éstas no son efectivas, para evitar las infecciones debidas a, entre otros ictiopatógenos, *Streptococcus parauberis*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium marinum* o *Candidatus arthromitus*; (ii) la variación de su efectividad dependiendo de la especie acuícola en la que se empleen; (iii) el grado de protección que ofrecen, frecuentemente muy limitado en el tiempo (*e.g.*, 3–6 meses) y, generalmente, sólo frente a determinadas especies patógenas (y, en muchos casos,

serotipos); (iv) el elevado coste económico; (v) la problemática de su aplicación en las etapas larvarias, tanto por la inmadurez de su sistema inmune como por la dificultad de su manejo; (vi) el retardo del crecimiento que pueden ocasionar; (vii) la disminución de su eficacia cuando no se emplean inmunoestimulantes o por diversos factores (*e.g.*, tamaño de los peces, tipo de adyuvantes adicionados en su formulación y salinidad); (viii) la limitación de su eficacia cuando los peces padecen otras enfermedades simultáneamente; (ix) las alteraciones que pueden provocar en la calidad del producto (*e.g.*, adherencias, inflamación crónica y melanosis), y, por último, (x) el estrés que su empleo provoca en los peces, especialmente cuando se administran mediante inyección intraperitoneal, con la consiguiente repercusión en su respuesta inmune y, por lo tanto, en su productividad (EFSA, 2008b; Toranzo *et al.*, 2009). En consecuencia, cada vez es mayor el interés por la investigación y el desarrollo de metodologías alternativas o complementarias a la quimioterapia y la vacunación, que no sólo resulten eficaces para el control de las ictiopatologías de mayor relevancia, sino que, además, sean seguras, respetuosas con el medio ambiente y cuya aplicación resulte sencilla y rentable económicamente. En este contexto, está adquiriendo una creciente relevancia el empleo de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes, independiente o conjuntamente, como alternativa a los antibióticos y otros compuestos quimioterapéuticos (*e.g.*, formaldehído, formalina y verde de malaquita) (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Merrifield *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Defoirdt *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011). Asimismo, desde hace unos años se están investigando y desarrollando otras estrategias de biocontrol, que se encuentran todavía en fase experimental y cuya eficacia y seguridad no han sido determinadas exhaustivamente, entre las que destacan (i) la utilización de bacteriófagos (o sus lisinas) específicos frente a determinados ictiopatógenos (*e.g.*, *F. psychrophilum* y *Vibrio harveyi*); (ii) la fototerapia o terapia basada en la fotodinámica, que permite la generación de radicales reactivos de oxígeno y otros compuestos antimicrobianos tras la excitación lumínica de fotosensores naturales o sintéticos (*e.g.*, colorantes orgánicos o derivados porfirínicos), y, por último, (iii) la terapia anti-virulencia, basada en la interrupción del sistema de comunicación entre bacterias patógenas (sistema *Quorum Sensing*), mediante la interacción con los reguladores de respuesta o la degradación enzimática de compuestos de bajo tamaño molecular, que son liberados al medio extracelular por algunas bacterias patógenas para controlar la densidad de su población, permitiendo la expresión de, por ejemplo, los genes relacionados con la formación de biopelículas (*biofilms*) y con diversos factores de virulencia requeridos para la infección del hospedador (Almeida *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2010; Defoirdt *et al.*, 2011; Natrah *et al.*, 2011).

En lo que respecta a los probióticos, Fuller los definió en 1989 como “microorganismos vivos que, en forma de suplementos alimentarios, afectan beneficiosamente al hospedador animal mediante una mejora de su equilibrio intestinal” (Fuller, 1989). En una definición más amplia, los probióticos para la acuicultura se consideran como cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador mediante: (i) la modificación de su microbiota y/o la de su medio ambiente; (ii) el incremento de la eficiencia en la asimilación del alimento y/o su valor nutritivo; (iii) el incremento de la resistencia del hospedador frente a las enfermedades; (iv) la mejora de su respuesta al estrés y su vigor, y/o (v) el incremento de la calidad del medio ambiente acuático en el que se desarrolla el hospedador.

Con base en esta definición, los probióticos pueden incluir cultivos microbianos que: (i) previenen la adhesión y proliferación de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal de los animales acuáticos, en las superficies de las piscifactorías y en el ambiente de cultivo; (ii) compiten eficazmente por los nutrientes disponibles; (iii) producen sustancias antimicrobianas; (iv) aseguran un aprovechamiento óptimo del alimento mediante su ayuda a la digestión (estimulación del crecimiento); (v) mejoran la calidad del agua, y/o (vi) estimulan la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, del hospedador (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). La primera aplicación de los probióticos en acuicultura se remonta a mediados de la década de los 80 del pasado siglo, no habiendo cesado desde entonces el interés de la comunidad científica por su empleo (Chabrillón *et al.*, 2007; Merrifield *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). Históricamente, los probióticos se han asociado a la ganadería y la medicina humana, limitándose principalmente su empleo a bacterias Gram-positivas, concretamente bacterias lácticas (fundamentalmente *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp.) y *Bifidobacterium* spp.; sin embargo, desde hace unos años también se ha propuesto la utilización en acuicultura de cultivos probióticos de bacterias Gram-negativas, bacteriófagos, levaduras y algas unicelulares (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Merrifield *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2010). En este contexto, la mayoría de los probióticos propuestos para su empleo en acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (principalmente *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y, en menor medida, *Streptococcus thermophilus*) y a los géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Vibrio* y *Pseudomonas* (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Dimitroglou *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010). Aunque las bacterias lácticas no constituyen la microbiota intestinal predominante de los peces, que está representada por los géneros *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (peces marinos) y *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Eubacterium* (peces de agua dulce), algunos géneros de este grupo, principalmente *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y, en menor medida, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Weissella*, forman parte de la microbiota intestinal de muchos peces cultivados, especialmente de los de agua dulce (Ringø y Holzapfel, 2000; Ringø *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2010), lo que avala su empleo como probióticos para la acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). A este respecto, numerosos estudios ponen de manifiesto la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la aplicación de bacterias lácticas como probióticos en acuicultura de peces y, aunque en menor medida, crustáceos y moluscos (Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). En lo que respecta a la acuicultura continental y marina de peces, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha hacen referencia al empleo de bacterias lácticas (principalmente de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Carnobacterium*) como probióticos de salmónidos, entre los que se incluyen el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha común (*Salmo trutta*), así como de, aunque en menor medida, otras especies de relevancia para la acuicultura mediterránea como, por ejemplo, la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus*

aurata), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), el lenguado (*Solea solea* y *Solea senegalensis*), la anguila (*Anguilla anguilla*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (para una revisión de la literatura reciente ver Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). No obstante, a pesar de los numerosos estudios realizados, conviene destacar que, hasta la fecha, en la UE sólo está autorizado (desde 2009) el empleo de un microorganismo (*Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5M, bacteria láctica registrada comercialmente como Bactocell®) como aditivo zootécnico para la acuicultura, concretamente para la mejora de la supervivencia y productividad de salmónidos y camarones.

De forma general, e independientemente del grupo de microorganismos empleado y de su procedencia (preferiblemente aisladas de los peces en los que se pretende emplear o su ambiente acuático), los tratamientos probióticos en acuicultura pueden considerarse como métodos de biocontrol (biorremediación) y probióticos *sensu stricto*. Como métodos de biocontrol, permiten la introducción de microorganismos que, mediante diferentes mecanismos, (i) posibilitan que los microorganismos patógenos puedan ser eliminados o reducidos en número en el ambiente acuícola; (ii) reducen la formación de *biofilms* causada por bacterias y hongos en las instalaciones (*biofouling*), y/o (iii) actúan como biorreactores y permiten el reciclaje de nutrientes (nitrógeno, fósforo y otras sustancias biodegradables) debido a la posibilidad de emplear el agua de desecho de las instalaciones para su crecimiento. Como probióticos *sensu stricto*, entre otros efectos beneficiosos favorecen que el hospedador se encuentre en un adecuado estado inmune para combatir al microorganismo patógeno (Panigrahi y Azad, 2007). En este sentido, los principales mecanismos por los que los probióticos ejercen su efecto beneficioso incluyen los siguientes: (i) supresión de microorganismos patógenos mediante exclusión competitiva mediada por la producción de uno o varios compuestos antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, lisozima, amonio, diacetilo, etc.) y sideróforos (*e.g.*, de hierro), por la competencia por los nutrientes y la energía disponibles, y/o por la competencia por los sitios de adhesión del intestino u otras superficies mucosas; (ii) mejora de la nutrición del hospedador debida al suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas, poliaminas y aminoácidos esenciales) y/o favorecimiento de la digestión (*e.g.*, producción de lipasas, amilasas y proteasas); (iii) estimulación de la respuesta inmune local y sistémica del hospedador (*e.g.*, activación de la respuesta humoral, incremento de la actividad fagocítica y respiratoria, aumento de la integridad de la barrera establecida por la mucosa intestinal, modulación de la proliferación y diferenciación de sus líneas celulares epiteliales, producción de lisozima, peroxidasa y proteasas, activación del complemento, producción de citoquinas, regulación de la angiogénesis y modificación de la actividad del sistema nervioso entérico), mediada por diversos componentes de la pared celular (*i.e.*, lipopolisacáridos, peptidoglicanos y β -glucanos) y, por último, (iv) incremento de la calidad del agua de cultivo (*e.g.*, conversión de materia orgánica en CO₂ y reducción de los niveles de amonio o nitritos) (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007b; Merrifield *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010).

Aunque la investigación sobre la utilización de probióticos en acuicultura se centró en un principio en los estadios juveniles y adultos de las especies acuícolas, cada vez es mayor el interés por su

aplicación durante la fase de incubación de los huevos embrionados, así como en las fases larvarias y de alevinaje y en el alimento vivo suministrado a larvas y alevines (*e.g.*, crustáceos, como *Artemia* spp., principalmente, *Artemia franciscana* y *Artemia salina*; rotíferos, como *Brachionus plicatilis*; cladóceros, generalmente *Daphnia* spp., y diversos copépodos) (Vine *et al.*, 2006). A este respecto, conviene mencionar que una de las dificultades encontradas en la producción intensiva de huevos, larvas y alevines es su elevada mortalidad, que puede superar el 99%, y el escaso crecimiento de las larvas y los alevines debido al efecto de bacterias patógenas oportunistas presentes en el agua de cultivo, lo que resulta favorecido por su capacidad de adhesión a los huevos embrionados, larvas y alevines, así como por la inmadurez del sistema inmunitario y digestivo de las larvas y alevines y por la “ausencia” de microbiota autóctona competitiva en su tracto gastrointestinal, branquias y piel. Por lo tanto, el control exhaustivo de la calidad microbiológica del agua de cultivo constituye un aspecto de especial relevancia para asegurar una producción intensiva de larvas y alevines (Verschuere *et al.*, 2000; Hjelm *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2006). Asimismo, la “ausencia” de microbiota competitiva establecida en larvas y alevines favorecería su colonización por los microorganismos adicionados como probióticos, especialmente si se trata de bacterias lácticas, dado que, como ya se ha mencionado, estos microorganismos no constituyen la flora predominante de los peces (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006). En consecuencia, actualmente se considera que el empleo de microorganismos como probióticos en acuicultura debería realizarse principalmente, aunque no de forma exclusiva, durante las fases larvaria y de alevinaje de las especies acuícolas. De forma general, la administración de probióticos se lleva a cabo mediante su adición a los piensos comerciales, bien una vez finalizado su proceso de elaboración (dado que los microorganismos se inactivan generalmente por las condiciones de procesamiento industrial) o en el momento de suministrarse a los peces; no obstante, diversos estudios demuestran una mayor eficacia cuando se adicionan directamente al agua de cultivo de los sistemas cerrados (fases larvaria y de alevinaje) o semicerrados (fase de engorde) de recircularización empleados en las modernas piscifactorías o al agua de cultivo del alimento vivo suministrado generalmente durante las fases larvaria y de alevinaje (*e.g.*, *A. franciscana*, *A. salina* y *B. plicatilis*), con el objetivo de incorporarlos al mismo y protegerlos de su inactivación (bioencapsulación) y, por lo tanto, favorecer su ingestión a dosis elevadas por las especies acuícolas a las que se suministre dicho alimento vivo “enriquecido” con la(s) especie(s) microbiana(s) de interés (Vine *et al.*, 2006; Dimitroglou *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010). Asimismo, la bioencapsulación de probióticos en el alimento vivo puede tener otras ventajas adicionales, entre las que se incluyen (i) el aumento de su productividad, y (ii) su protección frente a enfermedades, lo que, a su vez, evitaría que actúen como reservorios para la transmisión de microorganismos patógenos a las larvas y alevines de las especies acuícolas predadoras. Conviene destacar que la relevancia de la bioencapsulación de probióticos es indudable, ya que *A. franciscana* y, en menor medida, *A. salina* y *B. plicatilis* constituyen en la actualidad los principales alimentos vivos empleados en la larvicultura comercial de peces y mariscos, si bien, su elevada susceptibilidad a microorganismos patógenos del medio acuático provoca importantes pérdidas económicas, que pueden limitar su aplicación como alimento vivo en acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000; Dimitroglou *et al.*, 2011).

Con base en lo expuesto anteriormente, se propone como trabajo futuro la evaluación de la colección de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de origen marino obtenidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral para su empleo como probióticos en acuicultura, como estrategia de biocontrol de las ictiopatólogías de mayor relevancia para el cultivo intensivo de, en primer lugar, dos especies acuícolas de gran interés para la economía española: la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el rodaballo (*S. maximus*). Para lograr este objetivo se pretende identificar y seleccionar las bacterias lácticas con un mayor y más potente espectro de acción antimicrobiana frente a los ictiopatógenos de mayor relevancia para estas especies acuícolas, entre los que se incluyen *Lc. garvieae*, en el caso de la trucha arcoíris, y *Vibrio splendidus* y *T. maritimum*, para la fase larvaria y las fases juvenil y adulta del cultivo del rodaballo, respectivamente. Una vez evaluadas *in vitro* e *in vivo* la seguridad para el hombre, los peces y el medioambiente (*e.g.*, resistencias a antibióticos, factores de virulencia, actividades enzimáticas perjudiciales y citotoxicidad) y las características probióticas de estas bacterias lácticas (*e.g.*, supervivencia en el medio acuático, adhesión a las mucosas intestinales y epiteliales, competencia con ictiopatógenos por los receptores de las mucosas y estimulación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa), e identificadas y caracterizadas bioquímica, genética e inmunoquímicamente sus bacteriocinas, se evaluará su bioencapsulación en el alimento vivo (*A. franciscana*) y su eficacia *in vivo* para la protección de la trucha arcoíris, el rodaballo y su alimento vivo frente a los patógenos de mayor relevancia. De gran relevancia científico-técnica será también la determinación *in vitro* e *in vivo* del papel biológico de las bacteriocinas en las actividades probióticas de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas seleccionadas por su potencial como cultivos probióticos, para lo que se requerirá desarrollar mutantes isogénicos de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas deficientes en la producción de bacteriocinas, empleando para ello las técnicas de mutagénesis dirigida *in vitro* de los plásmidos bacteriocinogénicos y de inactivación *in vivo* de los genes estructurales de las bacteriocinas (*knockout*). Asimismo, se procederá al desarrollo de herramientas y técnicas moleculares (bioluminiscencia y fluorescencia) que permitan el marcado y la monitorización específica de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas más interesantes en los hospedadores y medios acuáticos a los que se adicionen como probióticos y biocontroladores. Posteriormente, se abordará un aspecto de gran relevancia que aún no ha sido convenientemente caracterizado y que consiste en la caracterización microbiológica y metagenómica del efecto del empleo de los cultivos probióticos en la estructura y dinámica poblacional de la microbiota de la trucha arcoíris y el rodaballo, así como de sus respectivos medios acuáticos. Por último, se procederá a la secuenciación y análisis funcional del genoma de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas con mayor potencial como probióticos para el cultivo intensivo de la trucha arcoíris y el rodaballo. Finalmente, conviene destacar que la utilización de bacterias lácticas bacteriocinogénicas como probióticos y biocontroladores en la acuicultura, como estrategia alternativa o complementaria a la quimioterapia y la vacunación, desempeñará un papel cada vez más importante en un futuro próximo para mejorar la salud y la productividad animal, contribuir a la calidad y la seguridad de los productos comercializados y minimizar el deterioro medioambiental del medio acuático de las piscifactorías y su entorno.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I. M., T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson e I. Storrø.** 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 159–166.
- Aasen, I. M., S. Markussen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson y K. Naterstad.** 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 35–43.
- Abee, T.** 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 1–9.
- Abee, T., L. Krockel y C. Hill.** 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169–185.
- Abriouel, H., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda y A. Gálvez.** 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods* 55: 599–605.
- Abriouel, H., R. Lucas, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Martínez-Canamero y A. Gálvez.** 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 383–397.
- Abriouel, H., N. B. Omar, A. C. Molinos, R. L. López, M. J. Grande, P. Martínez-Viedma, E. Ortega, M. M. Canamero y A. Gálvez.** 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 38–49.
- Achemchem, F., M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia y M. Maqueda.** 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99: 141–150.
- Achemchem, F., J. Abrini, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia y M. Maqueda.** 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *J. Food Prot.* 69: 2370–2376.
- Acuff, G., A. L. Izat y G. Firme.** 1984. Microbial flora on pond-reared tilapia (*Tilapia aurea*) held on ice. *J. Food Prot.* 47: 778–780.
- Adams, M. R.** 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68: 171–178.
- Adams, M. R. y P. Marteau.** 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 263–264.
- Adams, M. R. y L. Nicolaidis.** 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8: 227–239.
- Aguirre, M. y M. D. Collins.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95–107.
- Ahmed, Z., Y. Wang, Q. Cheng y M. Imran.** 2010. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 2843–2850.
- Ahn, C., D. Collins-Thompson, C. Duncan y M. E. Stiles.** 1992. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. *Plasmid* 27: 169–176.
- Al Bulushi, I. M., S. E. Poole, R. Barlow, H. C. Deeth y G. A. Dykes.** 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int. J. Food. Microbiol.* 138: 32–38.
- Alkhatib, Z., A. Abts, A. Mavaro, L. Schmitt y S. H. Smits.** 2012. Lantibiotics: how do producers become self-protected? *J. Biotechnol.* 159: 145–154.
- Allende, A., B. Martínez, V. Selma, M. I. Gil, J. E. Suárez y A. Rodríguez.** 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24: 759–766.
- Allison, G. E. y T. R. Klaenhammer.** 1996. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4450–4460.

- Allison, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer. 1995a. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1371–1377.
- Allison, G. E., C. Ahnn, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer. 1995b. Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 87–93.
- Al-Mathkhury, H. J., A. S. Ali y J. A. Ghafil. 2011. Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *N. Am. J. Med. Sci.* 3: 367–370.
- Almeida, A., A. Cunha, N. C. M. Gomes, E. Alves, L. Costa y M. A. F. Faustino. 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar. Drugs* 7: 268–313.
- Almeida, T., A. Brandão, E. Muñoz-Atienza, A. Gonçalves, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas y P. Poeta. 2011. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. *J. Food Prot.* 74: 1252–1260.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Altuntas, E. G., S. Cosansu y K. Ayhan. 2010. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *Int. J. Food Microbiol.* 141: 28–31.
- Alves, V. F., E. C. P. de Martinis, M. T. Destro, B. F. Vogel y L. Gram. 2005. Antilisterial activity of *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. *J. Food Prot.* 68: 2068–2077.
- Ammor, M. S., A. B. Florez y B. Mayo. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24: 559–570.
- Ammor, M. S., M. Guimonde, M. Danielsen, M. Zagorec, A. H. A. M. van Hoek, C. G. de los Reyes-Gavilan, B. Mayo y A. Margolles. 2008. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet*(L) and chromosomally located transposon-associated *tet*(M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1394–1401.
- Amores, R., A. Calvo, J. R. Maestre y D. Martínez-Hernández. 2004. Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17: 131–139.
- Ananou, S., M. Garriga, M. Hugas, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y E. Valdivia. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 179–190.
- Ananou, S., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y E. Valdivia. 2007. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 19–23.
- Ananou, S., A. Muñoz, M. Martínez-Bueno, P. González-Tello, A. Gálvez, M. Maqueda y E. Valdivia. 2010. Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive poder obtained by spray-drying. *Food Microbiol.* 27: 58–63.
- Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269–2272.
- Anónimo. 1991. Microbiological of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique (ISO 4832:1991). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo. 1999. Microbiology of food and feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO 6888-1:1999). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.

- Anónimo.** 2003a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees Celsius (ISO 4833:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo.** 2003b. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Antony, S. J., C. W. Stratton y J. S. Dummer.** 1996. *Lactobacillus* bacteraemia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 23: 773–778.
- Antunes, A., F. A. Rainey, M. F. Nobre, P. Schumann, A. M. Ferreira, A. Ramos, H. Santos y C. M. da.** 2002. *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 647–655.
- Apun, K., A. M. Yusof y K. Jugang.** 1999. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ. Health Res.* 9: 285–292.
- Aranha, C., S. Gupta y K. V. Reddy.** 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Contraception* 69: 333–338.
- Arihara, K., S. Ogihara, T. Mukai, M. Itoh e Y. Kondo.** 1996. Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 420–424.
- Aroutcheva, A., J. Simoes y S. Faro.** 2001. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 9: 33–40.
- Arques, J. L., E. Rodríguez, P. Gaya, M. Medina, B. Guamis y M. Núñez.** 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98: 254–260.
- Arvanitidou, M., V. Katsouyannopoulos y A. Tsakris.** 2001. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J. Med. Microbiol.* 50: 1001–1005.
- Asfie, M., T. Yoshijima y H. Sugita.** 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent *in situ* hybridization method. *Fish. Sci.* 69: 21–26.
- Ashie, I. N., J. P. Smith y B. K. Simpson.** 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 87–121.
- Ashraf, R. y N. P. Shah.** 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 149: 194–208.
- Askarian, F., A. Kousha y E. Ringø.** 2009. Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *J. Appl. Ichthyol.* 25: 91–94.
- Askarian, F., Z. Zhou, R. E. Olsen, S. Sperstad y E. Ringø.** 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterisation by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture* 326–329: 1–8.
- Atrih, A., N. Rekhif, A. J. Moir, A. Lebrihi y G. Lefebvre.** 2001. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 93–104.
- Audenaert, K., K. D'Haene, K. Messens, T. Ruysen, P. Vandamme y G. Huys.** 2010. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 27: 12–18.
- Audicana, A., I. Perales y J. J. Borrego.** 1995. Modification of kanamycin-esculin-azide agar to improve selectivity in the enumeration of fecal streptococci from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4178–4183.
- Austin, B.** 2002. The bacterial microflora of fish. *ScientificWorldJournal* 2: 558–572.

- Austin, B. y D. McIntosh.** 1991. New bacterial fish pathogens and their implications for fish farming. *Rev. Med. Microbiol.* 2: 230–236.
- Autio, T., S. Hiem, M. Miettinen, A. M. Sjöberg, K. Aarnisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm y H. Korkeala.** 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 150–155.
- Axelsson, L. y A. Holck.** 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177: 2125–2137.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink y A. Holck.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 137–143.
- Aymerich, M. T. y M. Hugas.** 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne* 72: 39–50.
- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga y I. F. Nes.** 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676–1682.
- Aymerich, M. T., M. Garriga, J. M. Monfort, I. F. Nes y M. Hugas.** 2000a. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiol.* 17: 33–45.
- Aymerich, M. T., M. G. Artigas, M. Garriga, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000b. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 88: 686–694.
- Aymerich, M. T. M. Garriga, J. Ylla, J. Vallier, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000c. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721–726.
- Aymerich, T., B. Martín, M. Garriga, M. C. Vidal-Carou, S. Bover-Cid y M. Hugas.** 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 100: 40–49.
- Azad, I. S. y A. Al-Marzouk.** 2008. Autochthonous aquaculture probiotics—A critical analysis. *Res. J. Biotechnol.* 3: 171–177.
- Azpiroz, M. F., M. E. Poey y M. Laviña.** 2009. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 47: 274–280.
- Baccus-Taylor, G., K. A. Glass, J. B. Luchansky y A. J. Maurer.** 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poult. Sci.* 72: 1772–1778.
- Baćun-Družina, V., J. Mrvčić, A. Butorac, V. Stehlik-Tomas y K. Gjuračić.** 2009. The influence of gene transfer on the lactic acid bacteria evolution. *Mljekarstvo* 59: 181–192.
- Badel, S., T. Bernardi y P. Michaud.** 2011. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29: 54–66.
- Bakkal, S., S. M. Robinson y M. A. Riley.** 2012. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. En: “*Health and environment in aquaculture*”, pp. 303–328, 1ª edición. Carvalho, E. D., G. Silva David y R. J. Silva (eds.). InTech, Rijeka, Croacia.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz.** 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114: 173–186.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés y J. L. Muzquiz.** 2007a. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 111–118.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Márquez, O. Gironés y J. L. Muzquiz.** 2007b. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *Br. J. Nutr.* 97: 522–527.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L. Muzquiz y O. Gironés.** 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188–191.

- Balla, E., L. M. T. Dicks, M. du Toit, M. J. van der Merwe y W. H. Holzapfel.** 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1298–1304.
- Baltzer, S. A. y M. H. Brown.** 2011. Antimicrobial peptides—Promising alternatives to conventional antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20: 228–235.
- Barefoot, S. F. y T. R. Klaenhammer.** 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808–1815.
- Bari, M. L., D. O. Ukuku, T. Kawasaki, Y. Inatsu, K. Isshiki y S. Kawamoto.** 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68: 1381–1387.
- Barrangou, R., S. J. Lahtinen, F. Ibrahim y A. C. Ouwehand.** 2012. Genus *Lactobacillus*. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 77–91, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Barret, J., A. Locker y C. Roberts.** 2004. The origins of intensive marine fishing in medieval Europe: the English evidence. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271: 2417–2421.
- Barrett, E., M. Hayes, P. O’Connor, G. Gardiner, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, R. P. Ross y C. Hill.** 2007. Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3719–3723.
- Barrett, E., R. P. Ross, P. W. O’Toole, G. F. Fitzgerald y C. Stanton.** 2012. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* 113: 411–417.
- Basanta, A.** 2007. Evaluación de la enterocina L50 (L50 A y L50 B) de *Enterococcus faecium* L50 como bioconservante de la cerveza. Producción y secreción heteróloga de las enterocinas L50A y L50B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45: 493–496.
- Bauer, R. y L. M. T. Dicks.** 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 101: 201–216.
- Baya, A. M., A. E. Toranzo, B. Lupiani, T. Li, B. S. Roberson y F. M. Hetrick.** 1991. Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3114–3120.
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Míguez, J. -F. Jetté, H. Aomari y M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43: 111–125.
- Beaulieu, L., H. Aomari, D. Groleau y M. Subirade.** 2006. An improved and simplified method for the large-scale purification of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43: 77–84.
- Bechinger, B.** 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 157–183.
- Beijerinck, M. W.** 1901. Sur les ferments lactiques de l’industrie. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles* (Section 2) 6: 212–243.
- Belfiore, C., J. Björkroth, E. Vihavainen, R. Raya y G. Vignolo.** 2010. Characterization of *Leuconostoc* strains isolated from fresh anchovy (*Engraulis anchoita*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56: 175–180.
- Ben Belgacem, Z., X. Dousset, H. Prevost y M. Manai.** 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *Arch. Microbiol.* 191: 711–720.

- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N. M. K. Yousif, C. M. A. P. Franz, W. H. Holzapfel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *System. Appl. Microbiol.* 27: 118–130.
- Benech, R.-O., E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix e I. Fliss. 2002a. Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3683–3690.
- Benech, R.-O., E. E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss. 2002b. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced *in situ* by mixed culture during Cheddar cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5607–5619.
- Benito, M. J., A. Martín, E. Aranda, F. Pérez-Nevado, S. Ruiz-Moyano y M. G. Córdoba. 2007. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *J. Food Sci.* 72: M193–M201.
- Benkerroum, N. y W. E. Sandine. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 71: 3237–3245.
- Benkerroum, N., Y. Ghouati, H. Ghalfi, T. Elmejdoub, D. Roblain, P. Jacques y P. Thonart. 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (Iben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Int. J. Dairy Technol.* 55: 145–151.
- Benkerroum, N., A. Daoudi, T. Hamraoui, H. Ghalfi, C. Thiry, M. Duroy, P. Evrart, D. Roblain y P. Thonart. 2005. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98: 56–63.
- Bennik, M., E. J. Smid y L. Gorris. 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2074–2076.
- Bennik, M. H. J., B. Vanloo, R. Brasseur, L. G. M. Gorris y E. J. Smid. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1373: 47–58.
- Benoit, V., A. Lebrihi, J.-B. Milliere y G. Lefebvre. 1997. Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB 27. *Curr. Microbiol.* 34: 173–179.
- Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan y T. M. Cogan. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259–274.
- Berjeaud, J.-M. e Y. Cenatiempo. 2004. Purification of antilisterial bacteriocins. *Methods Mol. Biol.* 268: 225–233.
- Bermúdez-Humarán, L. G., P. Kharat, J. M. Chatel y P. Langella. 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.* 10: S4.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet y M. Gueguen. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 278–285.
- Bernbom, N., T. R. Licht, C.-H. Brogren, B. Jelle, A. H. Johansen, I. Badiola, F. K. Vogensen y B. Nørrung. 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 239–244.
- Berry, E. D., R. W. Hutkins y R. W. Mandigo. 1991. The use of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* to control post-processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. *J. Food Prot.* 54: 681–686.
- Besselink, M., H. C. van Santvoort, E. Buskens, M. A. Boermeester, H. van Goor, H. M. Timmermann, V. B. Nieuwenhuis, T. L. Bollen, B. van Ramshorst, B. J. M. Witteman, C. Rosman, R. J. Ploeg, M. A. Brink, A. F. M. Schaapherder, C. H. Dejong, P. J. Wahab, C. J. H. M. van Laarhoven, E. van der Harst, C. H. J. van Eijck, M. A. Cuesta, L. M. A. Akkermans y H. G. Gooszen. 2008. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371: 651–659.

- Bessis, D., A. Le Quellec, A. Sotto, C. Perez y A. J. Ciurana. 1995. *Lactobacillus acidophilus* endocarditis after an appendectomy. *Clin. Infect. Dis.* 20: 724–725.
- Bested, A. C., A. C. Logan y E. M. Selhub. 2013. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: part III—convergence toward clinical trials. *Gut Pathog.* 5: 4.
- Bhatti, M., A. Veeramachaneni y L. A. Shelef. 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 215–219.
- Bhugaloo-Vial, P., X. Dousset, A. Metivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval y D. Marion. 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4410–4416.
- Bhugaloo-Vial, P., J. P. Douliez, D. Moll, X. Dousset, P. Boyaval y D. Marion. 1999. Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2895–2900.
- Biet, F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatempo y C. Fremaux. 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology* 144: 2845–2854.
- Billman-Jacobe, H. 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechnol.* 7: 500–504.
- Björkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. de Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3764–3772.
- Blanch, A. R., M. Alsina, M. Simon y J. Jofre. 1997. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J. Appl. Microbiol.* 82: 729–734.
- Blanco-Massani, M., M. R. Fernández, A. Ariosti, P. Eisenberg y G. Vignolo. 2008. Development and characterization of an active polyethylene film containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25: 1424–1430.
- Blanco-Massani, M., P. J. Morando, G. M. Vignolo y P. Eisenberg. 2012. Characterization of a multilayer film activated with *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. *J. Sci. Food Agric.* 92: 1318–1323.
- Blom, H., T. Katla, B. F. Hagen y L. Axelsson. 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 103–109.
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich y A. Sorokin. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731–753.
- Bolotin, A., S. D. Ehrlich y A. Sorokin. 2002. Studies of genomes of dairy bacteria *Lactococcus lactis*. *Sci. Aliment.* 22: 45–53.
- Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61–92.
- Borch, E., M. L. Kant-Muermans e Y. Blixt. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 103–120.
- Borrero, J. 2012. Caracterización de bacteriocinas y desarrollo de herramientas genéticas para su producción heteróloga en otras bacterias lácticas (BAL) y en las levaduras *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Arxula adenivorans*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiez, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2011a. Use of the *usp45* lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 131–143.

- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiez, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2011b. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156: 76–86.
- Borriello, S. P., W. P. Hammes, W. Holzapfel, P. Marteau, J. Schrezenmeier, M. Vaara y V. Valtonen.** 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 36: 775–780.
- Bortolussi, R.** 2008. Listeriosis: a primer. *CMAJ* 179: 795–797.
- Botha, S. J., S. C. Boy, F. S. Botha y R. Senekal.** 1998. *Lactobacillus* species associated with active caries lesions. *J. Dent. Assoc. S. Afr.* 53: 3–6.
- Botta, J. R.** 1991. Instrument for non destructive texture measurement of raw Atlantic cod (*Gadus morhua*) fillets. *J. Food Sci.* 56: 962–964.
- Bouksaim, M., C. Lacroix, R. Bazin y R. E. Simard.** 1999. Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immuno-location of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* 87: 500–510.
- Bouksaim, M., C. Lacroix, P. Audet y R. E. Simard.** 2000. Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 141–156.
- Boulares, M., L. Mejri y M. Hassouna.** 2011. Study of the microbial ecology of wild and aquacultured tunisian fresh fish. *J. Food Prot.* 74: 1762–1768.
- Bourouni, O. C., M. El Bour, R. Mraouna, H. Abdennaceur y A. Boudabous.** 2007. Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Ann. Microbiol.* 57: 185–190.
- Bouttefroy, A. y J. B. Millière.** 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 65–75.
- Bower, C. K., M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surf. B: Interfaces* 22: 259–265.
- Bower, C. K., J. E. Parker, A. Z. Higgins, M. E. Oest, J. T. Wilson, B. A. Valentin, M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2002. Protein antimicrobial barrier to bacterial adhesion: *in vitro* and *in vivo* evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf. B: Interfaces* 25: 81–90.
- Brahimi, M., P. Mathern, P. Fascia, J. M. Afchain y F. Lucht.** 2008. Two cases of *Lactobacillus rhamnosus* infection and pancreatitis. *Med. Mal. Infect.* 38: 29–31.
- Brandão, A., T. Almeida, E. Muñoz-Atienza, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, L. M. Cintas, P. Poeta y C. Herranz.** 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.* 192: 927–936.
- Bravo, J. A., P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, J. Bienenstock y J. F. Cryan.** 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 16050–16055.
- Brett, M. S. Y., P. Short y J. McLauchlin.** 1998. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 223–229.
- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, A. Bouttefroy y F. Leroi.** 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1029–1037.
- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal y F. Leroi.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 309–324.
- Broadbent, J. R., E. C. Neeno-Eckwall, B. Stahl, K. Tandee, H. Cai, W. Morovic, P. Horvath, J. Heidenreich, N. T. Perna, R. Barrangou y J. L. Steele.** 2012. Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics* 13: 533.

- Bron, P. A., M. G. Benchimol, J. Lambert, E. Palumbo, M. Deghorain, J. Delcour, W. M. de Vos, M. Kleerebezem y P. Hols. 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5663–5670.
- Brunvold, L., R. A. Sandaa, H. Mikkelsen, E. Welde, H. Bleie y Ø. Bergh. 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272: 319–327.
- Brurberg, M. B., I. F. Nes y V. G. H. Eijsink. 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26: 347–360.
- Bryan, E. M., T. Bae, M. Kleerebezem y G. M. Dunny. 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid* 44: 183–190.
- Bucio, A., R. Hartemink, J. W. Schrama, J. Verreth y F. M. Rombouts. 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with recirculation system. *Food Microbiol.* 23: 476–482.
- Buckenhüskes, H. J. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253–272.
- Budič, M., M. Rijavec, Ž. Petkovšek y D. Žgur-Bertok. 2011. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One* 6: e28769.
- Bujalance, C., E. Moreno, M. Jiménez-Varela y A. Ruiz-Bravo. 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 28–34.
- Burgess, C., M. O'Connell-Motherway, W. Sybesma, J. Hugenholtz y D. van Sinderen. 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin-enriched foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5769–5777.
- Burr, G. B., D. M. I. Gatlin y S. Ricke. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 36: 425–436.
- Buyong, N., J. Kok y J. B. Luchansky. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4842–4845.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8: 1137–1144.
- CAC (Codex Alimentarius Commission). 1999. Revised regional guidelines for the design of control measures for street-vended foods in Africa. CAC/GL-22–Rev. 1 (1999).
- CAC. 2007. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in Foods. CAC/GL-61–2007.
- Cahill, M. M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecol.* 19: 21–41.
- Cai, Y., L. K. Ng y J. M. Farber. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 83: 499–507.
- Cai, Y., P. Suyanandana, P. Saman e Y. Benno. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45: 177–184.
- Cakli, S., B. Kilinc, T. Dincer y S. Tolasa. 2006. Effects of using slurry ice during transportation on the microbiological, chemical, and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 453–458.
- Callanan, M., P. Kaleta, J. O'Callaghan, O. O'Sullivan, K. Jordan, O. McAuliffe, A. Sangrador-Vegas, L. Slattery, G. F. Fitzgerald, T. Beresford y R. P. Ross. 2008. Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.* 190: 727–735.

- Callewaert, R., M. Hugas y L. de Vuyst.** 2000. Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 57: 33–42.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal y J. Barros-Velazquez.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1: 43–63.
- Campbell, I.** 1997. Beer. En: “*Food microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 662–670. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY, EE.UU.
- Campos, C. A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado y J. Barros-Velázquez.** 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356–364.
- Canchaya, C., M. J. Claesson, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 152: 3185–3196.
- Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos y L. H. Danziger.** 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 31–40.
- Caplice, E. y G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131–149.
- Carminati, D., G. Giraffa, A. Quiberoni, A. Binetti, V. Suárez y J. Reinheimer.** 2010. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 177–191, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Carnevali, O., L. De Vivo, R. Sulpizio, G. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi y A. Cresci.** 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258: 430–438.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 1–16.
- Carr, F. J., D. Chill y N. Maida.** 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281–370.
- Casalta, E. y M. C. Montel.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 271–273.
- Casaus, P.** 1998. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin y D. Cavard.** 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 158–229.
- Castellano, P. y G. Vignolo.** 2006. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:194–199.
- Castellano, P., R. Raya y G. Vignolo.** 2003. Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 35–43.
- Castellano, P., C. González, F. Carduza y G. Vignolo.** 2010. Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci.* 85: 394–401.
- Castro, J., M. Marín, G. Costas, E. Abad, A. Punzón, J. Pereiro y A. Vázquez.** 2011. Atlas de las flotas de pesca españolas de aguas europeas y atlánticas. Instituto Español de Oceanografía (IEO), Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

- Cederland, A., G. H. Gudmundsson y B. Agerberth. 2011. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 278: 3942–3951.
- Cetinkaya, Y., P. Falk y C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686–707.
- Cha, D. S., J. Chen, H. J. Park y M. S. Chinnan. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. *Int. J. Food Sci. Tech.* 38: 499–503.
- Chabrilón, M., P. Díaz-Rosales, M. C. Balebona y M. A. Moriño. 2007. Application of lactic acid bacteria (LAB) as probiotics in fish farming. *Panorama Acuicola Magazine*, marzo/abril: 28–34.
- Chaillou, S., M. C. Champomier-Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beauvils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux y M. Zagorec. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* 23: 1527–1533.
- Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli y J. K. Collins. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61: 1636–1643.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie y W. A. van der Donk. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105: 633–684.
- Chazan, B., R. Raz, Y. Shental, H. Sprecher y R. Colodner. 2008. Bacteremia and pyelonephritis caused by *Lactobacillus jensenii* in a patient with urolithiasis. *Isr. Med. Assoc. J.* 10: 164–165.
- Cheigh, C. I. e Y. R. Pyun. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* 27: 1641–1648.
- Chen, C.-M., J. G. Sebranek, J. S. Dickson y A. F. Mendonca. 2004. Combining pediocin with post-packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *J. Food Prot.* 67: 1866–1875.
- Chen, H. y D. G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 82–100.
- Chen, Y., R. Shapira, M. Eisentein y T. J. Montville. 1997a. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 524–531.
- Chen, Y., R. D. Ludescher y T. J. Montville. 1997b. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770–4777.
- Chihib, N. -E., L. Monnerat, J. M. Membré y J.-L. Thozolan. 1999. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anerobic beer-spoilage bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 87: 438–446.
- Chikindas, M. L. y T. J. Montville. 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. En: “Control of foodborne microorganisms”, pp. 303–321. Junerja, V. K. y J. N. Sofos (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Chikindas, M. L., K. Venema, A. M. Ledeboer, G. Venema y J. Kok. 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 183–189.
- Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40: 294–305.
- Chung, K. T., J. S. Dickson y J. D. Crouse. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1329–1333.
- Cintas, L. M. 1995. Caracterización bioquímica y genética de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Cintas, L. M. y P. Casaus. 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.* diciembre: 89–95.

- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández y P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000a. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). Ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno y productos finales del catabolismo. *Alim. Equip. Tecnol.* julio-agosto: 83–90.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000b. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (II). Bacteriocinas. *Alim. Equip. Tecnol.* septiembre: 109–119.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000c. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* 318: 61–70.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281–305.
- Citti, R.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 22–28.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2008. *Lactobacillus* phylogenomics—towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2945–2954.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes y M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- CLSI.** 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100–S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- Clover, C.** 2005. The end of the line: how overfishing is changing the world and what we eat. Ebury Press, Londres, Reino Unido.
- Coates, D.** 2002. Inland capture fishery statistics of Southeast Asia: current status and information needs. Oficina Regional de la FAO para Asia y el Pacífico, Comisión de Pesca para Asia-Pacífico, Bangkok, Tailandia. RAP Publicación No. 2002/11.
- Cocolin, L. y K. Rantsiou.** 2007. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1403–1411.

- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Urso, C. Cantoni y G. Comi.** 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1883–1894.
- Cocolin, L., R. Foschino, G. Comi y M. Grazia Fortina.** 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 24: 752–758.
- Cocolin, L., P. Dolci, K. Rantsiou, R. Urso, C. Cantoni y G. Comi.** 2009. Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Sci.* 82: 125–132.
- Cocolin, L., P. Dolci y K. Rantsiou.** 2011. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci.* 89: 296–302.
- Coffey, A., M. Ryan, R. P. Ross, C. Hill, E. Arendt y G. Schwarz.** 1998. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 231–235.
- Cole, K., M. B. Farnell, A. M. Donoghue, N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. N. Eruslanov, L. I. Volodina, Y. N. Kovalev, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko, V. N. Borzenkov, O. E. Svetoch, T. Y. Kudryavtseva, I. Reyes-Herrera, P. J. Blore, F. Solis de los Santos y D. J. Donoghue.** 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult. Sci.* 85: 1570–1575.
- Collins, M. D., U. M. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martínez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams y S. Wallbanks.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 5–12.
- Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Wallbanks.** 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weisella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595–603.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 89–109, 1ª edición. Mozzì, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Colombo, F., F. Borgo y M. G. Fortina.** 2009. Genotypic characterization of non starter lactic acid bacteria involved in the ripening of artisanal Bitto PDO cheese. *J. Basic Microbiol.* 49: 521–530.
- Comunian, R., E. Daga, I. Dupre, A. Paba, C. Devirgiliis, V. Piccioni, G. Perozzi, D. Zonenschain, A. Rebecchi, L. Morelli, A. de Lorentiis y G. Giraffa.** 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 151–156.
- Connell, J. J.** 1988. Control de la calidad del pescado. Editorial Acribia S. A., Zaragoza, España.
- Connell, J. J. y R. Hardy.** 1987. Avances en tecnología de los productos pesqueros. Editorial Acribia S. A., Zaragoza, España.
- Connil, N., L. Plissoneau, B. Onno, M. F. Pilet, H. Prevost y X. Douset.** 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *J. Food Prot.* 65: 333–338.
- Contreras, B. G. L., L. de Vuyst, B. Devreese, K. Busanyova, J. Raymaeckers, F. Bosman, E. Sablon y E. J. Vandamme.** 1997. Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P–13139. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 13–20.
- Cookson, A. L., S. J. Noel, W. J. Kelly y G. T. Attwood.** 2004. The use of PCR for the identification and characterisation of bacteriocin genes from bacterial strains isolated from rumen or caecal contents of cattle and sheep. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 199–207.

- Coque, T. M., J. E. Patterson, J. M. Steckelberg y B. E. Murray.** 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregative substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* 171: 1223–1229.
- Corr, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill y C. G. Gahan.** 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 7617–7621.
- Corsetti, A., L. Settanni y D. van Sinderen.** 2004. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. *J. Appl. Microbiol.* 96: 521–534.
- Cossart, P.** 2007. Listeriology (1926–2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect.* 9: 1143–1146.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 61–75.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Cotter, P. D., R. P. Ross y C. Hill.** 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 95–105.
- Crandall, A. D. y T. J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 231–237.
- Criado, R.** 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Criado, R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- Crispie, F., D. Twomey, J. Flynn, C. Hill, P. Ross y W. Meaney.** 2005. The lantibiotic lactacin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 72: 159–167.
- Crow, V. L., F. G. Martley, T. Coolbear y S. J. Roundhill.** 1995. The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 5: 451–472.
- Cryan, J. F. y S. M. O'Mahony.** 2011. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behaviour. *Neurogastroenterol. Motil.* 23: 187–192.
- Cui, Y., C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu y H. Cui.** 2012. Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 16668–16707.
- Cunningham-Rundles, S., S. Ahrne, S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, A. M. Dunn, C. Grassey, G. Hinds y J. Cervia.** 2000. Probiotics and immune response. *Am. J. Gastroenterol.* 95: S22–S25.
- Cutter, C. N. y G. R. Siragusa.** 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 19–23.
- Daeschel, M. A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164–167.

- Daeschel, M. A.** 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. En: "*Bacteriocins of lactic acid bacteria*", pp. 63–91. Hoover, D. G. y L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Daeschel, M. A. y H. P. Fleming.** 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1: 303–313.
- Daeschel, M. A., D.-S. Jung y B. T. Watson.** 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 601–603.
- Dalbey, R. E., M. O. Lively, S. Bron y J. M. van Dijl.** 1997. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* 6: 1129–1138.
- Dalet, K., C. Briand, Y. Cenatiempo e Y. Héchard.** 2000. The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 441–443.
- Dalet, K., Y. Cenatiempo, P. Cossart e Y. Héchard.** 2001. A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 3263–3269.
- Dalgaard, P., L. Gram y H. H. Huss.** 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 283–294.
- Danielsen, M. y A. Wind.** 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 1–11.
- Danielsen, M., A. Wind, J. J. Leisner y M. Apri.** 2007. Antimicrobial susceptibility of human blood culture isolates of *Lactobacillus* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 287–289.
- Daoudi, L., C. Turcotte, C. Lacroix e I. Fliss.** 2001. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 114–119.
- Dassa, E.** 2000. ABC transport. En: "*Encyclopedia of microbiology, vol. 1*", pp. 1–12. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Dassa, E. y P. Bouige.** 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152: 211–229.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle y J. Chen.** 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 317–364.
- Davies, E. A. y J. Delves-Broughton.** 2000. Nisin. En: "*Encyclopedia of food microbiology*", pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Davies, E. A., C. F. Milne, H. E. Bevis, R. W. Potter, J. M. Harris, G. C. Williams, L. V. Thomas y J. Delves-Broughton.** 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 62: 1004–1010.
- Davies, J., E. Ewan, P. Varughese y S. Acres.** 1984. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Clin. Invest. Med.* 7: 315–320.
- Daw, M. A. y F. R. Falkner.** 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron.* 27: 467–479.
- Dayem, M. A., Y. Fleury, G. Devilliers, E. Chaboisseau, R. Girard, P. Nicolas y A. Delfour.** 1996. The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 251–259.
- de Castro, A., A. Montaña, F.-J. Casado, A.-H. Sánchez y L. Rejano.** 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19: 637–644.
- de Jong, A., S. A. F. T. van Hijum, J. J. E. Bijlsma, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* 34: 273–279.

- de Kwaadsteniet, M., T. Fraser, C. A. van Reenen y L. M. T. Dicks.** 2006. Bacteriocin T8, a novel class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761–4766.
- de la Fuente-Salcido, N. M., J. E. Barboza-Corona, A. N. Espino Monzón, R. D. Pacheco Cano, N. Balagurusamy, D. K. Bideshi y R. Salcedo-Hernández.** 2012. Expanding the use of a fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ScientificWorldJournal* 2012: 503269.
- de Ruyter, P. G., O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662–3667.
- de Valk, H., V. Vaillant, C. Jacquet, J. Rocourt, F. Le Querrec, F. Stainer, N. Quelquejeu, O. Pierre, V. Pierre, J. C. Desenclos y V. Goulet.** 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999–February 2000. *Am. J. Epidemiol.* 154: 944–950.
- de Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer y W. B. Whitman.** 2009. The Firmicutes. En: “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, vol. 3, 2ª edición. Springer, Nueva York, NY, EE.UU.
- de Vos, W. M.** 1999a. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 9: 3–10.
- de Vos, W. M.** 1999b. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 289–295.
- de Vuyst, L. y E. J. Vandamme.** 1994a. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 1–8. de Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- de Vuyst, L. y E. J. Vandamme.** 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 9–129. de Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- de Vuyst, L. y F. Leroy.** 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- de Vuyst, L., R. Callewaert y K. Crabbè.** 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142: 817–827.
- de Vuyst, L., M. R. Foulquié-Moreno y H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 299–318.
- de Vuyst, L., L. Avonts, P. Neysens, B. Hoste, M. Vancanneyt, J. Swings y R. Callewaert.** 2004. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 93–106.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 251–258.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Degnan, A. J., C. W. Kaspar, W. S. Otwell, M. L. Tamplin y J. B. Luchansky.** 1994. Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food-grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3198–3203.
- del Campo, R., C. Tenorio, R. Jiménez-Díaz, C. Rubio, R. Gómez-Lus, F. Baquero y C. Torres.** 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 905–912.
- Delgado, A., D. Brito, C. Peres, F. Noé-Arroyo y A. Garrido-Fernández.** 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol.* 22: 521–528.

- Delgado, S., A. B. Flórez y B. Mayo.** 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.* 50: 202–207.
- Delves-Broughton, J.** 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 57: 525–527.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans y J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Denev, S., Y. Staykov, R. Moutafchieva y G. Beev.** 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and potential application of probiotic and probiotic in finfish aquaculture. *Int. Aquat. Res.* 1: 1–29.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier e Y. Fleury.** 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs* 8: 1153–1177.
- Destoumieux-Garzón, D., J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2002. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 84: 511–519.
- Desvaux, M., N. J. Parham e I. R. Henderson.** 2004. The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* 155: 53–60.
- Devereaux, J., P. Haeblerli y O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res.* 12: 387–395.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren y J. Debevere.** 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14: 273–285.
- Díaz, M., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Fernández, A. Santos, H. Ramírez-Rodrigo y M. Maqueda.** 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1229–1236.
- DiChristina, T. J. y E. F. DeLong.** 1994. Isolation of anaerobic respiratory mutants of *Shewanella putrefaciens* and genetic analysis of mutants deficient in anaerobic growth on Fe^{3+} . *J. Bacteriol.* 176: 1464–1474.
- Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen y E. Johansen.** 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol. Microbiol.* 15: 839–847.
- Dicks, L. M. T. y A. Endo.** 2009. Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 30: 72–90.
- Dicks, L. M. T., F. D. Mellett y L. C. Hoffman.** 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Sci.* 66: 703–708.
- Diep, D. B. e I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Diep, B. D., L. S. Håvarstein, J. Nissen-Meyer e I. F. Nes.** 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 160–166.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18: 631–639.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472–4483.
- Diep, D. B., L. Axelsson, C. Grefslie e I. F. Nes.** 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146: 2155–2160.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo e I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2384–2389.
- Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot y J.-C. Piard.** 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7281–7288.

- Díez-González, F.** 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8: 15–23.
- Dimitrijevic, R., M. Stojanovic, I. Zivkovic, A. Peterson, R. M. Jankov, L. Dimitrijevic y M. Gavrovic-Jankulovic.** 2009. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. *J. Appl. Microbiol.* 107: 2108–2115.
- Dimitroglou, A., D. L. Merrifield, O. Carnevali, S. Picchietti, M. Avella, C. Daniels, D. Güroy y S. J. Davies.** 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production-A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 1–16.
- Donohue, D. C. y M. Gueimonde.** 2012. Some considerations for the safety of novel probiotics bacteria. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 423–438, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Donohue, D. C., S. Salminen y P. Marteau.** 1995. Safety of probiotic bacteria. En: “*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 369–383, 2ª edición. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Dortu, C., M. Huch, W. H. Holzapfel, C. M. Franz y P. Thonart.** 2008. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 581–586.
- Dos Santos-Nascimento, J., P. Carlin, M. A. Vasconcelos, K. R. Netto y M. C. F. Bastos.** 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106: 61–71.
- Dos Santos-Nascimento, J. S., H. Ceotto, S. B. Nascimento, M. Giambiagi-deMarval, K. R. N. Santos y M. C. F. Bastos.** 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 215–221.
- Drahovska, H., L. Slobodnikova, D. Kocincova, M. Seman, R. Koncekova, J. Trupl y J. Turna.** 2004. Antibiotic resistance and virulence factors among clinical and food enterococci isolated in Slovakia. *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 763–768.
- Draper, L. A., R. P. Ross, C. Hill y P. D. Cotter.** 2008. Lantibiotic immunity. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 9: 39–49.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen y H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Driessen, A. J. M. y C. van der Does.** 2002. Protein export in bacteria. En: “*Protein targeting, transport and translocation*”, pp. 47–73. Dalbey, R. E. y G. von Heijne (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Driessen, A. J. M. y N. Nouwen.** 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 643–667.
- Driessen, A. J. M., H. W. van de Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.-G. Sahl, R. N. H. Konings y W. N. Konings.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34: 1606–1614.
- Driessen, A. J. M., P. Fekkes y J. P. W. van der Wolk.** 1998. The *sec* system. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 216–222.
- Driessen, A. J. M., C. van der Does y N. Nouwen.** 2002. Bacterial protein secretion and targeting. En: “*Biopolymers, vol. 7*”, pp. 227–259. Fahnstock, S. y A. Steinbüchel (eds.). Wiley-VCH, Nueva York, NY, EE.UU.
- du Toit, M., L. Engelbrecht, E. Lerm y S. Krieger-Weber.** 2011. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food Bioprocess Technol.* 4: 876–906.
- Duffes, F., F. Leroy, P. Boyaval y X. Dousset.** 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 33–42.
- Duffes, F., C. Corre, F. Leroy, X. Dousset y P. Boyaval.** 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62: 1394–1403.

- Dufour, A., T. Hindré, D. Haras y J. P. Le Pennec.** 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 134–167.
- Duport, C., C. Baysse e Y. Michel-Briand.** 1995. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 270: 8920–8927.
- Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2007a. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24: 708–734.
- Duquesne, S., V. Petit, J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2007b. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 200–209.
- Durazo Beltrán, E.** 2006. Aprovechamiento de los productos pesqueros. Universidad Autónoma de Baja California, México.
- Dutka-Malen, S., S. Evers y P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24–27. *Erratum*, 33: 1434.
- Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax.** 2002. “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Dyer, F. E.** 1947. The microorganisms from Atlantic cod. *J. Fish Res. Board Can.* 7: 128–136.
- Eaton, T. J. y M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Bruselas, Bélgica.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2005c. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 223: 1–12.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.
- EFSA.** 2008a. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732: 1–15.
- EFSA.** 2008b. Scientific report of EFSA prepared by Working Group on trout welfare on animal welfare aspects of husbandry for farmed trout. Annex I to *EFSA J.* 796: 1–97.
- EFSA.** 2008c. Scientific opinion on food safety considerations of animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish. *EFSA J.* 867: 1–24.
- EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.
- EFSA.** 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobial of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10: 2740.
- Eijsink, V. G. H., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven e I. F. Nes.** 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178: 2232–2237.
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg e I. F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.

- Eijlsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo e I. F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- Einarsson, H. y H. L. Lauzon. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669–676.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato y T. Matsui. 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- Enan, G., A. A. el-Essawy, M. Uyttendaele y J. Debevere. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 189–215.
- Engelsen, A. R., N. Sandlund, I. U. Fiksdal y O. Bergh. 2008. Immunohistochemistry of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* experimentally challenged with *Vibrio anguillarum*. *Dis. Aquat. Organ.* 80: 13–20.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, F. Bringel, J. C. Hubert y C. Hasselman. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4381–4387.
- Ennahar, S., O. Assobhel y C. Hasselmann. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* 61: 186–191.
- Ennahar, S., K. Sonomoto y A. Ishizaki. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705–716.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Ennahar, S., Y. Asou, T. Zendo, K. Sonomoto y A. Ishizaki. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 291–301.
- Epand, R. M. y H. J. Vogel. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11–28.
- Eppert, I., N. Valdés-Stauber, H. Götz, M. Busse y S. Scherer. 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium lines* as evaluated in situ on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4812–4817.
- Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad y W. Tham. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2904–2907.
- Falagas, M. E., G. I. Betsi y S. Athanasiou. 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 657–664.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Información sobre la Ordenación Pesquera del Reino de España. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO. 2003-2009. Fisheries topics: utilization. Processing fish and fish products. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 2006 15 09. [Cited 8 January 2010]. <http://www.fao.org/fishery/topic/736/en>.
- FAO. 2004a. Risk assesement of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological Risk Assessment Series, N° 5: 265.
- FAO. 2004b. Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fish.Tech. Pap.* N° 444.
- FAO. 2005-2011a. World inventory of fisheries. Reducing post-harvest losses. Issues Fact Sheets. Text by Lahsen Ababouch. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 27 May 2005. [Cited 28 November 2011]. <http://www.fao.org/fishery/topic/12369/en>.

- FAO.** 2005-2011b. Fisheries and Aquaculture topics. Safety of fish and fish products. Topics Fact Sheets. Text by Lahsen Ababouch. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 27 May 2005. [Cited 25 May 2011]. <http://www.fao.org/fishery/topic/1514/en#container>.
- FAO.** 2007. Resumen informativo sobre la pesca por países. El Reino de España. Departamentos de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO.** 2012. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization).** 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. FAO y WHO, Roma, Italia.
- Farber, J. M. y P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476–511.
- Farzanfar, A.** 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48: 149–158.
- Fath, M. J. y R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57: 995–1017.
- FDA/FSIS (U. S. Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Service).** 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition (USDA) and Food Safety Inspection Service.
- Fekkes, P. y A. J. M. Driessen.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrana. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 161–173.
- Felis, G. E. y F. Dellaglio.** 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 44–61.
- Fernández-Macho, J., C. Gallastegui y P. González.** 2004. Economic impacts of the Galician fishing sector: a supply-driven SAM approach. *JEL classification:* Q22, R15, C67, D57.
- Fett, W. F. y G. T. Maher.** 1985. Bacteriocin production by *Xanthomonas campestris* pv *glycines*. *Phytopathology* 75: 1280.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3313–3318.
- Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5057–5060.
- Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643–2648.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2002a. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148: 3661–3670.
- Fimland, G., V. G. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2002b. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* 41: 9508–9515.
- Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus y J. Nissen-Meyer.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11: 688–696.
- Fimland, G., J. Pirneskoski, J. Kaewsrichan, A. Jutila, P. E. Kristiansen, P. K. Kinnunen y J. Nissen-Meyer.** 2006. Mutational analysis and membrane-interactions of the beta-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 1132–1140.
- Fitzsimons, N. A., T. M. Cogan, S. Condon y T. Beresford.** 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90: 600–608.
- Fleet, G. H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 101–117.

- Fleet, G. H.** 2001. Wine. En: “*Food Microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 671–694. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY., EE.UU.
- Flórez, A. B., M. S. Ammor, S. Delgado y B. Mayo.** 2006. Molecular analysis of a chromosome-carried *erm(B)* gene and its flanking insertion points in *Lactobacillus johnsonii* G41. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 4189–4190.
- Flórez, A. B., V. Ladero, P. Álvarez-Martín, M. S. Ammor, M. G. Álvarez y B. Mayo.** 2007. Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30: 341–344.
- Flórez, A. B., M. S. Ammor, B. Mayo, A. H. A. M. van Hoek, H. J. M Aarts y G. Huys.** 2008. Antimicrobial susceptibility profiles of 32 type strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31: 484–504.
- Flynn, S., D. van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes y J. K. Collins.** 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology* 148: 973–984.
- Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington y T. R. Klaenhammer.** 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 884–890.
- Font de Valdez, G., C. L. Gerez, M. I. Torino y G. Rollán.** 2010. New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 273–287, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Fontana, C., S. Fadda, P. S. Cocconcelli y G. Vignolo.** 2012. Lactic acid bacteria in meat fermentations. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 247–264, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Forde, B. M., B. A. Neville, M. M. O'Donnell, E. Riboulet-Bisson, M. J. Claesson, A. Coghlan, R. P. Ross y P. W. O'Toole.** 2011. Genome sequences and comparative genomics of two *Lactobacillus ruminis* strains from the bovine and human intestinal tracts. *Microb. Cell Fact.* 10: S13.
- Foulquié-Moreno, M. R., M. C. Rea, T. M. Cogan y L. de Vuyst.** 2003a. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73–84.
- Foulquié-Moreno, M. R., R. Callewaert, B. Devreese, J. van Beeumen y L. de Vuyst.** 2003b. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94: 214–229.
- Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. de Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Franke, C. M.** 1998. Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Franz, C. M. A. P. y W. H. Holzapfel.** 2012. Examples of lactic-fermented foods of the African continent. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 265–284, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Franz, C. M. A. P., U. Schillinger y W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 255–270.
- Franz, C. M. A. P., M. Du Toit, N. A. Olasupo, U. Schillinger y W. H. Holzapfel.** 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 231–235.
- Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel y M. E. Stiles.** 1999a. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1–24.

- Franz, C. M. A. P., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1999b. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170–2178.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, R. W. Worobo, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 2000. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology* 146: 621–631.
- Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings y W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C. M., A. Grube, A. Herrmann, H. Abriouel, J. Starke, A. Lombardi, B. Tauscher y W. H. Holzapfel.** 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2550–2554.
- Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer y W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105–122.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel y A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Franz, C. M. A. P., G.-S. Cho, W. H. Holzapfel y A. Gálvez.** 2010. Safety of lactic acid bacteria. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 341–359, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Fraser, O. P. y S. Sumar.** 1998a. Compositional changes and spoilage in fish—an introduction. *Nutr. Food Sci.* 98: 275–279.
- Fraser, O. P. y S. Sumar.** 1998b. Compositional changes and spoilage in fish (part II)—microbiological induced deterioration. *Nutr. Food Sci.* 98: 325–329.
- Fremaux, C., C. Ahn y T. R. Klaenhammer.** 1993. Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3906–3915.
- Fremaux, C., Y. Hécharde y Y. Cenatiempo.** 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology* 141: 1637–1645.
- Fricourt, B. V., S. F. Barefoot, R. F. Testin y S. S. Hayasaka.** 1994. Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. *J. Food Protect.* 57: 698–702.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365–378.
- Gajic, O.** 2003. Relationships between MDR proteins, bacteriocin production and proteolysis in *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers y J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291–34298.
- Gallart Jornet, L., I. Escriche Roberto y P. Fito Maupoey.** 2005. La salazón del pescado, una tradición en la dieta mediterránea. Ed. UPV (Universidad Politécnica de Valencia). Valencia, España.
- Gallemore, G. H., R. T. Mohon y D. A. Ferguson.** 1995. *Lactobacillus fermentum* endocarditis involving a native mitral valve. *J. Tenn. Med. Assoc.* 88: 306–308.
- Gálvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada y E. Montoya.** 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 32: 765–771.
- Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia.** 1989. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140: 57–68.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López y N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.

- Gálvez, A., R. L. López, H. Abriouel, E. Valdivia y N. B. Omar.** 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 125–152.
- Gardiner, E. G., R. P. Ross, P. M. Kelly, C. Stanton, J. U. D. Collins y G. Fitzgerald.** 2002. Microbiology of therapeutic milks. En: "Dairy Microbiology Handbook", pp. 431–466. Robinson, R. K. (ed.). J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Garneau, S., N. I. Martín y J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Garneau, S., A. C. A. Ference, M. J. van Belkum, M. E. Stiles y J. C. Vederas.** 2003 Purification and characterization of brochocin A and brochocin B (10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1352–1358.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich y J. M. Monfort.** 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 142–148.
- Garriga, M., M. T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509–518.
- Garriga, M., T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000. Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. *Eurocarne* 87: 59–63.
- Garrity, G. M., J. A. Bell y T. G. Lilburn.** 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 2ª edición, Release 5.0. Springer-Verlag, Nueva York, NY, EE.UU.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham y G. L. De Antoni.** 2010. Microbial interactions in kefir: a natural probiotic drink. En: "Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: novel applications", pp. 327–339, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Garver, K. I. y P. M. Muriana.** 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 241–258.
- Garver, K.I. y P. M. Muriana.** 1994. Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2191–2195.
- Garza-Velasco, R., K. Hernández-Acosta y A. G. Mejía-Chávez.** 2002. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *LABORAT-acta* 14: 11–20.
- Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur* 92: 45–67.
- Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1–9.
- Gatesoupe, F. J.** 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147–165.
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 107–114.
- Geisen, R. y W. H. Holzapfel.** 1996. Genetically modified starter and protective cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 315–324.
- Gennari, M., S. Tomaselli y V. Catrona.** 1999. The microflora of fresh and spoilage sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. *Food Microbiol.* 16: 15–28.
- Gevers, D., M. Danielsen, G. Huys y J. Swings.** 2003a. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1270–1275.
- Gevers, D., L. Masco, L. Baert, G. Huys, J. Debevere y J. Swings.** 2003b. Prevalence and diversity of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their *tet* genes along the process line of fermented dry sausages. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 277–283.
- Ghalfi, H., A. Allaoui, J. Destain, N. Benkerroum y P. Thonart.** 2006. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Prot.* 69: 1066–1071.

- Ghalfi, H., N. Benkerroum, M. Ongena, M. Bensaid y P. Thonart.** 2010. Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. *Food Res. Int.* 43:33–39.
- Ghanbari, M., M. Rezaei, M. Jami y R. M. Nazari.** 2009. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from intestinal contents of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Iran J. Vet. Res.* 10: 152–157.
- Gil Hernández, A.** 2010. Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Gill, H. S., J. Prasad y O. Donkor.** 2012. Probiotics and human immune function. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 439–508, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Gillor, O. y L. Ghazaryan.** 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2: 115–122.
- Gillor, O., L. M. Nigro y M. A. Riley.** 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1067–1075.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall y D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Giraffa, G.** 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 291–299.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215–222.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 251–260.
- Giraffa, G., E. Neviani y A. Veneroni.** 1990. Use of conductance to detect bacteriocin activity. *J. Food Prot.* 53: 772–776.
- Giraffa, G., D. Carminati y G. Torri Tarelli.** 1995. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.* 58: 621–623.
- Giraffa, G., D. Carminati y E. Neviani.** 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food. Prot.* 60: 732–737.
- Giraffa, G., N. Chanishvili e Y. Widyastuti.** 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* 161: 480–487.
- Glenting, J., S. M. Madsen, A. Vrang, A. Fomsgaard y H. Israelsen.** 2002. A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5051–5056.
- Gobalet, K. W. y T. L. Jones.** 1995. Prehistoric native American fisheries of the central California coast. *Trans. Am. Fish. Soc.* 124: 813–823.
- Gómez Giráldez, F. J.** 1987. Estudio del sector pesquero gallego. Publicacións da Caixa de Galicia, España.
- Gong, H. S., X. C. Meng y H. Wang.** 2010. Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella typhimurium*. *J. Basic Microbiol.* 50: S37–45.
- González, B., P. Arca, B. Mayo y J. E. Suárez.** 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158–2163.
- González, C. J., T. M. López-Díaz, M. L. García-López, M. Prieto y A. Otero.** 1999. Bacterial microflora of Wild brown trout (*Salmo trutta*), Wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62: 1270–1277.

- González, C. J., J. P. Encinas, M. L. García-López y A. Otero.** 2000. Characterisation and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiol.* 17: 383–391.
- González, I., R. Martín, T. García, P. Morales, B. Sanz y P. E. Hernández.** 1994a. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos I. Técnicas fisicoquímicas. *Alimentación, equipos y tecnología XIII* 4: 97–101.
- González, I., R. Martín, T. García, P. Morales, B. Sanz y P. E. Hernández.** 1994b. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos II. Técnicas inmunológicas y genéticas. *Alimentación, equipos y tecnología XIII* 5: 79–83.
- Gonzalez-Rodríguez, M. N., J. J. Sanz, J. A. Santos, A. Otero y M. L. García-López.** 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 161–168.
- Gosalbes, M. J., C. D. Esteban, J. L. Galán y G. Pérez-Martínez.** 2000. Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4822–4828.
- Gould, G. W.** 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. (Suppl.)*: 82–86.
- Graham J., W. A. Johnston y F. J. Nicholson.** 1993. El hielo en las pesquerías. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 331.
- Gram, L.** 1992. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 25–39.
- Gram, L. y H. H. Huss.** 1996. Microbial spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–137.
- Gram, L. y P. Dalgaard.** 2002. Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 262–266.
- Gram, L., G. Trolle y H. H. Huss.** 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4: 65–72.
- Gram, L., C. Wedell-Neergaard y H. H. Huss.** 1990. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *Int. J. Food Microbiol.* 10: 303–316.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, M. Martínez-Cañamero, E. Valdivia y A. Gálvez.** 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 289–297.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006a. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 185–194.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006b. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* 101: 422–428.
- Grande, M. J., R. L. López, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2007a. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food. Prot.* 70: 405–411.
- Grande, M. J., H. Abriouel, R. L. López, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2007b. Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *J. Food. Prot.* 70: 2339–2345.
- Graves, L. M., B. Swaminathan y S. B. Hunter.** 1999. Subtyping *Listeria monocytogenes*. En: “*Listeria, listeriosis and food safety*“, pp. 279–297, 2ª edición. Ryser, E.T. y Marth, E.H. (eds.). Marcel Dekker, Nueva York, NY, EE.UU.
- Gravesen, A., P. Warthoe, S. Knochel y K. Thirstrup.** 2000. Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants show consistent overexpression of a putative β -glucoside-specific PTS system. *Microbiology* 146: 2361–2369.

- Gravesen, A., A.-M. J. Axelsen, J. M. da Silva, T. B. Hansen y S. Knøchel. 2002a. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 756–764.
- Gravesen, A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jänsch, Y. Héchard, J. W. Hastings y S. Knøchel. 2002b. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148: 2361–2369.
- Gravesen, A., B. Kallipolitis, K. Holmstrøm, P. E. Højby, M. Ramnath y S. Knøchel. 2004. pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1669–1679.
- Gregersen, T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 123–127.
- Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko y L. Morelli. 2005. Should yogurt cultures be considered probiotic? *Brit. J. Nutr.* 93: 783–786.
- Guder, A., I. Wiedemann y H.-G. Sahl. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins: the lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Sci.)* 55: 62–73.
- Gueimonde, M., C. G. de los Reyes-Gavilán y B. Sánchez. 2012. Stability of lactic acid bacteria in foods and supplements. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 361–383, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1316–1325.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross. 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 77–83.
- Gulland, J. A. 1982. Why do fish numbers vary? *J. Afr. Econ.* 97: 69–75.
- Gursky, L. J., N. I. Martin, D. J. Derksen, M. J. van Belkum, K. Kaur, J. C. Vederas, M. E. Stiles y L. M. McMullen. 2006. Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch. Microbiol.* 186: 317–325.
- Gutiérrez, J. 2005. Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2004. Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2005a. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3004–3008.
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández y C. B. Míguez. 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 125–131.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2005c. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 239–250.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok y P. E. Hernández. 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 41–51.
- Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J. M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1744–1748.

- Gänzle, M. G., C. Hertel, J. M. B. M. van der Vossen y W. P. Hammes. 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 21–35.
- Haard, N. F. 1993. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.* 25: 289–307.
- Hagi, T. y T. Hoshino. 2009. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1479–1483.
- Hagi, T., D. Tanaka, Y. Iwamura y T. Hoshino. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234: 335–346.
- Hall, G. M. 2002. Lactic acid bacteria in fish preservation. En: “*Safety and quality issues in fish processing*”, pp. 330–349. Bremner, H. A. (ed.). CRC Press LLC, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Hammes, W. P. y R. F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*. En: “*The genera of Lactic Acid Bacteria*” volumen 2, pp. 19–54. Wood, B. J. B. y W. H. Holzapfel (eds.). Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, Glasgow, Reino Unido.
- Hammes, W. P. y C. Hertel. 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: “*The Prokaryotes*” volumen 4, pp. 320–403. Dworkin, M. (ed.). Springer-Verlag, Nueva York, NY, EE.UU.
- Hamon, M., H. Bierne y P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 423–434.
- Han, S. F., Y. C. Liu, Z. G. Zhou, S. He, Y. Cao, P. Shi, B. Yao y E. Ringø. 2010. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquacul. Res.* 42: 47–56.
- Hancock, R. E. W. y A. Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 143–149.
- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317–1323.
- Hancock, R. E. W., T. Falla y M. Brown. 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37: 135–175.
- Hansen, G. H. y J. A. Olafsen. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1435–1446.
- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer. 1992a. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial *sauerkraut* fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1477–1483.
- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer. 1992b. Novel paired starter culture system for *sauerkraut*, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1484–1489.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan y D. van Sinderen. 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108: 169–177.
- Harwood, V. J., J. Whitlock y V. Withington. 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3698–3704.
- Hata, T., R. Tanaka y S. Ohmomo. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int. J. Food Microbiol.* 137: 94–99.
- Hauge, H. H., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes y V. G. H. Eijsink. 1998. Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. Enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur. J. Biochem.* 251: 565–572.
- Haugen, H. S., P. E. Kristiansen, G. Fimland y J. Nissen-Meyer. 2008. Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6766–6773.

- Hebert, E. M., L. Saavedra, M. P. Taranto, F. Mozzi, C. Magni, M. E. Nader, G. Font de Valdez, F. Sesma, G. Vignolo y R. R. Raya.** 2012. Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. *J. Bacteriol.* 194: 538–539.
- Héchar, Y. y H.-G. Sahl.** 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545–557.
- Héchar, Y., C. Pelletier, Y. Cenatiempo y J. Frère.** 2001. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 1575–1580.
- Helander, I. M., A. von Wright y T.-M. Mattila-Sandholm.** 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 146–150.
- Henderson, J. T., A. L. Chopko y P. D. Dyck van Wassenaar.** 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1-0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 5–12.
- Henning, S., R. Metz y W. R. Hammes.** 1986. Studies on the mode of action on nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 3: 121–134.
- Héquet, A., V. Laffitte, L. Simon, D. De Sousa-Caetano, C. Thomas, C. Fremaux y J. M. Berjeaud.** 2007. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 67–74.
- Herbert, R. A. y J. M. Shewan.** 1975. Precursors of the volatile sulphides in spoiling North Sea Cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 26: 1195–1202.
- Herbert, R. A. y J. M. Shewan.** 1976. Roles played by bacterial and autolytic enzyme in the production of volatile sulfides in spoiling North Sea Cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 27: 89–94.
- Hereu, A., S. Bover-Cid, M. Garriga y T. Aymerich.** 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 154: 107–112.
- Hernández, P.** (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 469.
- Herra, C. M., M. T. Cafferky y C. T. Keane.** 1995. The *in vitro* susceptibilities of vaginal lactobacilli to four broad-spectrum antibiotics, as determined by the agar dilution and E-test methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 775–783.
- Herranz, C.** 2001. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Herranz, C. y A. J. M. Driessen.** 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959–1963.
- Herranz, C., S. Mukhopadhyay, P. Casaus, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39: 282–290.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2001a. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 18: 115–131.
- Herranz, C., Y. Chen, H.-J. Chung, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville y M. L. Chikindas.** 2001b. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1689–1692.
- Herranz, C., J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2001c. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 378–383.
- Herrera, F. C., J. A. Santos, A. Otero y M. L. García-López.** 2006. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 100: 527–536.

- Herreros, M. A., J. M. Fresno, M. J. González Prieto y M. E. Tornadillo. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Int. Dairy J.* 13: 469–479.
- Hetz, C., M. R. Bono, L. F. Barros y R. Lagos. 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2696–2701.
- Heu, S., J. Oh, Y. Kang, S. Ryu, S. K. Cho, Y. Cho y M. Cho. 2001. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4105–4110.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill. 2001. Exploitation of plasmid pMRC01 to direct transfer of mobilizable plasmids into commercial lactococcal starter strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2853–2858.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149: 655–664.
- Higgins, C. F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205–210.
- Hijano Baola, A., P. Carreño Freire, J. C. Estévez Muñoz y C. García de la Rasilla Cooper. 2005. Sospecha de escombroidosis. *SEMERGEN* 31: 329–330.
- Hill, C. y T. O’Keeffe. 2003. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of dairy sciences*”, pp. 129–135. Roginski, H., J. W. Fuqay y P. F. Fox (eds.). Academic Press, Bodmin, Reino Unido.
- Hiu, S. F., R. A. Holt, N. Sriringanathan, R. J. Seidler y J. L. Fryer. 1984. *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 393–400.
- Hjelm, M., Ø. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck y L. Gram. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 360–371.
- Hobbs, G. 1982. Changes in fish after catching. En: “*Fish handling and processing*”, pp. 20–27, 2ª edición. Aitken A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt y M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido.
- Hoffmann, A., U. Pag, I. Wiedemann y H.-G. Sahl. 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Farmaco* 57: 685–691.
- Holck, A. L., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust y H. Blom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715–2720.
- Holck, A. L., L. Axelsson, K. Huehne y L. Kroeckel. 1994a. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 143–150.
- Holck, A., L. Axelsson y U. Schillinger. 1994b. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr. Microbiol.* 29: 63–68.
- Holo, H. e I. F. Nes. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119–3123.
- Holo, H., Ø. Nissen e I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Holo, H., Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic e I. F. Nes. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* 147: 643–651.
- Holtmark, I., V. G. H. Eijsink y M. B. Brurberg. 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 280: 1–7.
- Holzappel, W. H. y U. Schillinger. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 35: 109–116.
- Holzappel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343–362.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger y J. H. Huis in’t Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101.

- Holzappel, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth y U. Schillinger.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S–373S.
- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y H. M. Dodd.** 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 818–823.
- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y H. M. Dodd.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4443–4450.
- Horwath, C. A., H. A. Furseth, A. M. Larson, T. L. Jones, J. F. Olliffe y D. H. Spach.** 1995. Lactobacillemia in three patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 21: 1460–1462.
- Hovda, M. B., B. T. Lunestad, R. Fontanillas y J. T. Rosnes.** 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272: 581–588.
- Howell, T. H., J. P. Fiorellini, P. Blackburn, S. J. Projan, J. de la Harpe y R. C. Williams.** 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* 20: 335–339.
- Huang, J., C. Lacroix, H. Daba y R. E. Simard.** 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* in milk and its control by pediocin 5 produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Int. Dairy J.* 4: 429–443.
- Huber, I., B. Spanggaard, K. F. Appel, L. Rossen, T. Nielsen y L. Gram.** 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* 96: 117–132.
- Huerta, R., R. Jordano, L. M. Medina y C. López.** 2004. Population dynamics of the constitutive biota of French dry sausages in a pilot-scale ripening chamber. *J. Food Prot.* 67: 2306–2309.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49: S139–S150.
- Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich y J. M. Monfort.** 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Microbiol.* 79: 322–330.
- Hugas, M., F. Pagés, M. Garriga y J. M. Monfort.** 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15: 639–650.
- Hugas, M., M. Garriga y M. T. Aymerich.** 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 223–233.
- Hugenholtz, J. y G. de Veer.** 1991. Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. En: “*Nisin and novel lantibiotics*”, pp. 440–447. Sahl, H.-G. y J. Jung (eds.). ESCOM Scientific Publishers BV, Leiden, Países Bajos.
- Hugenholtz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols y M. Kleerebezem.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 217–235.
- Hughes, B. F. y L. L. McKay.** 1991. Deriving phage-insensitive lactococci using a food-grade vector encoding phage and nisin resistance. *J. Dairy Sci.* 75: 914–923.
- Huidobro, A. y M. Tejada.** 1990. Determinación analítica de los compuestos nitrogenados no proéticos en el músculo de pescado. Aplicación al control de calidad. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 30: 293–301.
- Hummel, A. S., W. H. Holzappel y C. M. A. P. Franz.** 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 1–7.
- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzappel y C. M. A. P. Franz.** 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 730–739.
- Hunt, C. P.** 1998. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br. J. Biomed. Sci.* 55: 149–156.

- Hurst, A.** 1981. Nisin. En: “*Advances in Applied Microbiology*, vol. 27”. Perlman, D. y A. I. Laskin (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Hurtado, A., C. Reguant, A. Bordons y N. Rozès.** 2011a. Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiol.* 28: 1339–1344.
- Hurtado, A., N. Ben Othman, N. Chammem, M. Hamdi, S. Ferrer, C. Reguant, A. Bordons y N. Rozes.** 2011b. Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiol.* 28: 1514–1518.
- Huss, H. H.** 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 348.
- Huss, H. H.** 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 334.
- Huss, H. H.** 1999. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 348.
- Huss, H. H., L. V. Jørgensen y B. F. Vogel.** 2000a. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 267–274.
- Huss, H. H., A. Reilly y P. K. Ben Embarek.** 2000b. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11: 149–156.
- Hutchings, J. A. y J. K. Baum.** 2005. Measuring marine fish biodiversity: temporal changes in abundance, life history and demography. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 315–338.
- Huys, G., K. D’Haene y J. Swings.** 2002. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 402–406.
- Huys, G., K. D’Haene, J.-M. Collard y J. Swings.** 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1555–1562.
- Hühne, K., L. Axelsson, A. Holck y L. Kröckel.** 1996. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology* 142: 1437–1448.
- Hyldig, G. y D. Nielsen.** 2001. A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. *J. Texture Stud.* 32: 219–242.
- Håvarstein, L. S., H. Holo e I. F. Nes.** 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140: 2383–2389.
- Håvarstein, L. S., D. B. Diep e I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229–240.
- Ingham, A., M. Ford, R. J. Moore y M. Tizard.** 2003. The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1365–1371.
- Inoue, T., H. Tomita e Y. Ike.** 2006. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1202–1212.
- Irianto, A. y B. Austin.** 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25: 1–10.
- Ishibashi, N. y S. Yamazaki.** 2001. Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 465S–470S.
- Islam, B., S. N. Khan y A. U. Khan.** 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Med. Sci. Monit.* 13: RA196–RA203.
- Itoi, S., T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, Y. Kanomata y H. Sugita.** 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 116–121.
- Iwen, P. C., C. Mindru, A. C. Kalil y D. F. Florescu.** 2012. *Pediococcus acidilactici* endocarditis successfully treated with daptomycin. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1106–1108.
- Izvekova, G. I., E. I. Izvekov y A. O. Plotnikov.** 2007. Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Biol. Bull.* 34: 610–618.

- Jabrane, A., A. Sabri, P. Compère, P. Jacques, I. Vandenberghe, J. van Beeumen y P. Thonart.** 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5704–5710.
- Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
- Jack, R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. Wettenhall, M. W. Hickey y M. J. Coventry.** 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2897–2903.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch y E. Wollman.** 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur* 84: 222–224.
- Jacquet, T., C. Cailliez-Grimal, G. Francius, F. Borges, M. Imran, J. F. Duval y A. M. Revol-Junelles.** 2012. Antibacterial activity of class IIa bacteriocin Cbn BM1 depends on the physiological state of the target bacteria. *Res. Microbiol.* 163 : 323–331.
- Jana, S. y J. K. Deb.** 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 289–298.
- Jatoba, A., F. do Nascimento Vieira, C. B. Neto, B. Corrêa Silva, J. L. Pedreira Mouriño, G. Tomas Jerônimo, G. Dotta y M. Laterça Martins.** 2008. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43: 1201–1207.
- Jellinek, G.** 1985. Sensory evaluation of food—Theory and Practice. Ellis Horwood, Ltd. (ed.). Chichester, Reino Unido.
- Jennes, W., L. M. T. Dicks y D. J. Verwoerd.** 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.* 88: 349–357.
- Jeppesen, V. F. y H. H. Huss.** 1993a. Characteristic and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 18 : 305–320.
- Jeppesen, V. F. y H. H. Huss.** 1993b. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 179–186.
- Jespersen, L. y M. Jakobsen.** 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.
- Jiménez-Díaz, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruíz-Barba y J. C. Piard.** 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416–1424.
- Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner.** 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459–4463.
- Joerger, M. C. y T. R. Klaenhammer.** 1990. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J. Bacteriol.* 172: 6339–6347.
- Joerger, R. D.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Sci.* 82: 640–647.
- Joerger, R. D., D. G. Hoover, S. F. Barefoot, K. M. Harmon, D. A. Grinstead y C. G. Nettles-Cutter.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of Microbiology*”, pp. 383–397, 2ª edición. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, EE.UU.
- Joffraud, J. J., F. Leroi, C. Roy y J. L. Berdagué.** 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 66: 175–184.
- Jofré, A., M. Garriga y T. Aymerich.** 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *J. Food Prot.* 70: 2498–2502.

- Johansen, E.** 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. *Genet. Mol. Res.* 2: 112–116.
- Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2647–2652.
- Johnsen, L., G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Johnsen, L., B. Dalhus, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2005b. 1.6-Å crystal structure of entA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.* 280: 19045–19050.
- Jones, R. J., H. M. Hussein, M. Zagorec, G. Brightwell y J. R. Tagg.** 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.* 25: 228–234.
- Jørgensen, L. V. y H. H. Huss.** 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 127–131.
- Kageyama, M.** 1964. Studies of a Pyocin: I. Physical and chemical properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 55: 49–53.
- Kaiser, A. L. y T. J. Montville.** 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4529–4535.
- Kalchayanand, N., M. B. Hanlin y B. Ray.** 1992. Sublethal injury makes gram-negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239–243.
- Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne y B. Ray.** 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61: 425–431.
- Kaletta, C. y K.-D. Entian.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171: 1597–1601.
- Kalmokoff, M. L., F. Bartlett y R. M. Teather.** 1996. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? *J. Dairy Sci.* 79: 2297–2306.
- Kanatani, K., M. Oshimura y K. Sano.** 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061–1067.
- Kanawjia, S. K., K. Nageswara Rao, S. Singh y L. Sabikhi.** 1993. Role of Lactobacilli in cheese. *Indian J. Dairy Sci.* 46: 187–197.
- Kandler, O. y N. Weiss.** 1986. Genus *Lactobacillus*. En: “*Bergey’s Manual of Systematics Bacteriology*”, volumen 2. pp. 1209–1234. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, MD, EE.UU.
- Kang, J. H. y M. S. Lee.** 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1169–1176.
- Kant, R., J. Blom, A. Palva, R. J. Siezen y W. de Vos.** 2010. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microb. Biotechnol.* 4: 323–332.
- Kapetanovic, D., B. Kurtovic y E. Teskeredzic.** 2005. Differences in Bacterial Population in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry after transfer from incubator to pools. *Food Technol. Biotechnol.* 43: 189–193.
- Katikou, P., I. Ambrosiadis, D. Georgantelis, P. Koidis y S. A. Georgakis.** 2005. Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances' producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1303–1313.
- Katla, A.-K., H. Kruse, G. Johnsen y H. Herikstad.** 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 147–152.

- Katla, T., T. Møretrø, I. M. Aasen, A. Holck, L. Axelsson y K. Naterstad.** 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18: 431–439.
- Katla, T., K. Naterstad, M. Vancanneyt, J. Swings y L. Axelsson.** 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin a, pediocin PA-1, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4431–4437.
- Kato, T., T. Matsuda, E. Ogawa, H. Ogawa, H. Kato, U. Doi y R. Nakamura.** 1994. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 277–282.
- Kawai, Y., T. Saito, M. Suzuki y T. Itoh.** 1998. Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 887–892.
- Kawai, Y., B. Saitoh, O. Takahashi, H. Kitazawa y T. Saito.** 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2201–2208.
- Kawai, Y., Y. Ishii, K. Uemura, H. Kitazawa, T. Saito y T. Itoh.** 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* 18: 407–415.
- Kawai, Y., R. Kemperman, J. Kok y T. Saito.** 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 393–398.
- Kawamoto, S., J. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita y T. Sameshima.** 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3830–3840.
- Kayser, F. H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255–262.
- Kazazic, M., J. Nissen-Meyer y G. Fimland.** 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specific of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148: 2019–2027.
- Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Coulette y M. G. Bergeron.** 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3497–3503.
- Kelly, W. J., R. V. Asmundson y C. M. Huang.** 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 209–218.
- Kelman, J. H.** 1982. Handling wet fish at sea. En: “*Fish handling and processing*”, pp. 28–41. Aitken, A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt y M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers y J. Kok.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A y closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1589–1597.
- Kent, M., L. Alexander y R. H. Christie.** 1992. Seasonal variation in the calibration of a microwave fat: water content meter for fish flesh. *Int. J. FoodSci. Technol.* 27: 137–143.
- Keren, T., M. Yarmus, G. Halevy y R. Shapira.** 2004. Immunodetection of the bacteriocin lactacin RM: analysis of the influence of temperature and Tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2098–2104.
- Khan, H., S. Flint y P.-L. Yu.** 2010. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141: 1–10.
- Kierńczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud y M. Yvon.** 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microb.* 69: 734–739.
- Kim, D. H., J. Brunt y B. Austin.** 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 102: 1654–1664.
- Kim, J. H. y D. A. Mills.** 2007. Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid* 58: 275–283.

- Kim, T.-S., J.-W. Hur, M.-A. Yu, C.-I. Cheigh, K.-N. Kim, J.-K. Hwang e Y.-R Pyun.** 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food. Prot.* 66: 3–12.
- Kim, W. J., R. J. Hall y N. W. Dunn.** 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 449–453.
- Kjos, M., J. Borrero, M. Opsata, D. J. Birri, H. Holo, L. M. Cintas, L. Snipen, P. E. Hernández, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157: 3256–3267.
- Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–349.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–86.
- Klare, I., G. Werner y W. Witte.** 2001. Enterococci: habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. En: “*Emerging bacterial pathogens. Contrib. Microbiol. vol. 8*”, pp. 108–122. Mühldofer, I. y K. P. Schäfer (eds.). Basel/Karger, Suiza.
- Klare, I., C. Konstabel, D. Badstubner, G. Werner y W. Witte.** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 269–290.
- Klare, I., C. Konstabel, S. Muller-Bertling, R. Reissbrodt, G Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, H. Goossens y W. Witte.** 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8982–8986.
- Klare, I., C. Konstabel, G. Werner, G. Huys, V. Vankerckhoven, G. Kahlmeter, B. Hildebrandt, S. Müller-Bertling, W. Witte y H. Goossens.** 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 900–912.
- Kleerebezem, M. y L. E. Quadri.** 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* 22: 1579–1596.
- Kleerebezem, M. y E. E. Vaughan.** 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria : molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* 63 : 269–290.
- Kleerebezem, M., L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1997a. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895–904.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos y O. P. Kuipers.** 1997b. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4581–4584.
- Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Tarchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. Klein Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. Nierop Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos y R. J. Siezen.** 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1990–1995.
- Kleerebezem, M., P. Hols, E. Bernard, T. Rolain, M. Zhou, R. J. Siezen y P. A. Bron.** 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 199–230.
- Klein, C. y K. D. Entian.** 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2793–2801.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte y G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103–125.
- Klein, G., C. Hallmann, I. A. Casas, J. Abad, J. Louwers y G. Reuter.** 2000. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.* 89: 815–824.

- Knerr, P. J. y W. A. van de Donk.** 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 479–505.
- Koch, S., M. Hufnagel, C. Theilacker y J. Huebner.** 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822–830.
- Kojic, M., J. Lozo, B. Jovicic, I. Strahinic, D. Fira, y L. Topisirovic.** 2010. Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. *Int. J. Food Microbiol.* 140: 117–124.
- Kok, J., G. Buist, A. L. Zomer, S. A. F. T. van Hijum y O. P. Kuipers.** 2005. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 411–433.
- Kolding, J. y P. A. M. van Zwieten.** 2006. Improving productivity in tropical lakes and reservoirs. Challenge Program on Water and Food-Aquatic Ecosystems and Fisheries Review Series 1. Theme 3 of CPWF, WorldFish Center, Cairo, Egipto.
- Komitopoulou, E., I. S. Boziaris, E. A. Davies, J. Delves-Broughton y M. R. Adams.** 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34: 81–85.
- Konings, W. N., J. Kok, O. P. Kuipers y B. Poolman.** 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Op. Microbiol.* 3: 276–282.
- Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 125–144.
- Kopermsub P. y S. Yunchalard.** 2010. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 200–204.
- Korkeala, H., T. Alanko y T. Tiusanen.** 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta. Vet. Scand.* 33: 27–32.
- Kramer, N. E.** 2005. Nisin resistance in Gram-positive bacteria. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Kramer, N. E., S. A. F. T. van Hijum, J. Knol, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1753–1761.
- Kraus, H.** 1961. Mitteilung über das Vorkommen von Lactobazillen auf frischen Heringen. *Arch. Lebensmittelhyg.* 12: 101–102.
- Kreil, G.** 1994. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview. En: “*Antimicrobial Peptides*”, pp. 77–90. Bomam, H. G., J. Marsh y J. A. Goode (eds.). Wiley, Nueva York, NY, EE.UU.
- Krier, F., A. M. Revol-Junelles y P. Germain.** 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 359–363.
- Kubota, M., M. Kinoshita, S. Kubota, M. Yamashita, H. Toyohara y M. Sakaguchi.** 2001. Possible implication of metalloproteinases in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fish. Sci.* 67:965–968.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink y W. M. de Vos.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299–27304.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15: 135–140.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. *Quorum sensing* controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Kuipers, A., J. Wierenga, R. Rink, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers y G. N. Moll.** 2006. Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7626–7633.

- Kullen, M. K., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell y T. R. Klaenhammer.** 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89: 511–516.
- Kunji, E. R. S., D. J. Slotboom y B. Poolman.** 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1610: 97–108.
- Kurlansky, M.** 2003. Salt: a world history. Vintage books, Londres, Reino Unido.
- Kuroda, K. y R. Kagiya.** 1983. Biochemical relationship among three F-type pyocins, pyocin F1, F2, and F3, and phage KF1. *J. Biochem.* 94: 1429–1441.
- Kvasnikov, E. I., N. K. Kovalenko y L. G. Materinskaya.** 1977. Lactic acid bacteria of freshwater fish. *Mikrobiologiya* 46: 619–624.
- Ladrat, C., V. Verrez-Bagnis, J. Noël y J. Fleurence.** 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81: 517–525.
- Lagos, R., M. Tello, G. Mercado, V. García y O. Monasterio.** 2009. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 74–85.
- Lahtinen, E. J. y A. Endo.** 2012. Health effects of nonviable probiotics. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 671–688, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Land, M. H., K. Rouster-Stevens, C. R. Woods y M. L. Cannon.** 2005. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115: 178–181.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, S. Sierra, J. M. Rodríguez, J. Bouza y J. Xaus.** 2007. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br. J. Nutr.* 98: S96–S100.
- Larsen, A. G. y B. Nørrung.** 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 132–134.
- Larsen, A. G., F. K. Vogensen y J. Josephsen.** 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 113–122.
- Lauková, A.** 2012. Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 39–61, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Lauková, A. y S. Czikková.** 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 215–218.
- Lauková, A., M. Mareková y P. Javorsky.** 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4321. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 257–260.
- Lauková, A., S. Czikková, Z. Vasilková, P. Juris e I. Krupicer.** 1998. Antimicrobial effect of enterocin CCM 4231 in the cattle slurry environment. *Cytobios* 94: 73–79.
- Lauková, A., S. Czikková, S. Laczková y P. Turek.** 1999. Use of enterocins CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 115–119.
- Lauková, A., P. Juriš, Z. Vasilková e I. Papajová.** 2000. Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V24 in cattle dung water. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 402–405.
- Lauzon, H. L. y E. Ringø.** 2012. Prevalence and application of lactic acid bacteria in aquatic environments. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 593–631, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Lauzon, H. L., S. Gudmundsdottir, S. K. Petursdottir, E. Reynisson, A. Steinarsson, M. Oddgeirsson, R. Bjornsdottir y B. K. Gudmundsdottir.** 2010. Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing systems at pre- and posthatch stages and the effect of different treatments. *J. Appl. Microbiol.* 109 : 1775–1789.

- Lawson, P. A., P. Papademas, C. Wacher, E. Falsen, R. Robinson y M. D. Collins. 2001. *Lactobacillus cypricaei* sp. nov., isolated from Halloumi cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 45–49.
- Lawton, E. M., R. P. Ross, C. Hill y P. D. Cotter. 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev. Med. Chem.* 7: 1236–1247.
- Lee, H. y H. Y. Kim. 2011. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 229–235.
- Lee, H. I., M. H. Kim, K. Y. Kim y J. S. So. 2010. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe* 16: 522–526.
- Lee, J., J. Jang, B. Kim, J. Kim, G. Jeong y H. Han. 2004. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis. *J. Microbiol. Methods* 59: 1–6.
- Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema y J. Kok. 1998. Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 417–423.
- Leer, R., J. van der Vossen, M. van Giesen, H. van Noort y P. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141: 1629–1635.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein y T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev. Immunol.* 11: 105–128.
- Leisner, L., J. C. Milan, H. H. Huss y L. M. Larsen. 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugar-salted fish. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 417–423.
- Leisner, J. J., G. G. Greer y M. E. Styles. 1996. Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2610–2614.
- Leistner, L. 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* 25: 151–158.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Leistner, L. y L. G. M. Gorris. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 41–46.
- Lejeune, R., R. Callewaert, K. Crabbé y L. de Vuyst. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol.* 84: 159–168.
- Lerm, E., L. Engelbrecht y M. du Toit. 2011. Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starters cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32: 280–295.
- Leroi, F. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27: 698–709.
- Leroi, F., N. Arbey, J. Joffraud y F. Chevalier. 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending shelf-life of vacuum-packed cold-smoked salmon. *Int. J. Sci. Technol.* 31: 497–504.
- Leroi, F., J. Joffraud, F. Chevalier y M. Cardinal. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 111–121.
- Leroy, F. y L. de Vuyst. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 974–981.
- Leroy, F. y L. de Vuyst. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 155–164.
- Leroy, F. y L. de Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67–78.
- Leroy, F. y L. de Vuyst. 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 141–152.
- Leroy, F., M. R. Foulquié Moreno y L. de Vuyst. 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 235–240.

- Leroy, F., J. Verluoyten y L. de Vuyst.** 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270–285.
- Leung, P. P., M. Khadre, T. H. Shellhammer y A. E. Yousef.** 2002. Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 199–204.
- Lewin, B.** 2004. The *Sec* system transports proteins into and through the inner membrane. En: “*Genes VIII*”, pp. 221–222. Carlson, G. y J. Challice (eds). Pearson Education, Inc., New Jersey, NJ, EE.UU.
- Lin, C. F., Z. F. Fung, C. L. Wu y T. C. Chung.** 1996. Molecular characterisation of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from *Lactobacillus reuteri*. *Plasmid* 36: 116–124.
- Lin, S.-H., S. Miyata, W. Weng, W. Matsunaga, J. Ichikawa, K. Furuya, T. Nakashima, T. Kiyohara, O. P. Kuipers, P. G. G. A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Line, J. E., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, B. S. Seal, G. R. Siragusa y N. J. Stern.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1094–1100.
- Liston, J.** 1980. Microbiology in fishery science. En: “*Advances in fishery science and technology*”, pp. 138–157. Connell, J. J. (ed.). Fishing News Books Ltd., Farnham, Reino Unido.
- Liu, J. Y., A. H. Li, C. Ji y W. M. Yang.** 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet. Microbiol.* 136: 314–320.
- Liu, L., P. O’Conner, P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1059–1066.
- Liu, Y., Z. Zhou, B. Yao, P. Shi, S. He, L. B. Hølvold y E. Ringø.** 2008. Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquac. Res.* 29: 635–646.
- Ljungh, A. y T. Wadström.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7: 73–89.
- Lohans, C. T. y J. C. Vederas.** 2012. Development of Class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.* 2012: 386410
- Lohner, K. y E. J. Prenner.** 1999. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 141–156.
- Loncarevic, S., W. Tham y M. L. Danielsson-Tham.** 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in smoked and 'gravad' fish. *Acta Vet. Scand.* 37: 13–18.
- Lorca, G., L. Reddy, A. Nguyen, E. I. Sun, J. Tseng, M.-R. Yen y M. H. Saier.** 2010. Lactic acid bacteria: comparative genomic analyses of transport systems. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 73–87, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Lorenzo, J. M., M. C. Garcia-Fontán, A. Cachaldora, I. Franco y J. Carballo.** 2010. Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacon (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiol.* 27: 229–235.
- Losteinkit, C., K. Uchiyama, S. Ochi, T. Takaoka, K. Nagahisa y S. Shioya.** 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 390–395.
- Love, R. M.** 1982. Basic facts about fish. En: “*Fish handling and processing*”, pp. 2–19, 2ª edición. Aitken A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt y M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido.

- Lozo, J., B. Jovcic, M. Kojic, M. Dalgalarrrondo, J. M. Chobert, T. Haertlé y L. Topisirovic.** 2007. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr. Microbiol.* 55: 266–271.
- Lubelski, J., A. de Jong, R. van Merkerk, H. Agustindari, O. P. Kuipers, J. Kok y A. J. Driessen.** 2006. LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 61: 771–781.
- Lucas, R., M. J. Grande, H. Abriouel, M. Maqueda, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1774–1781.
- Luchansky, J. B., K. A. Glass, K. D. Harsono, A. J. Degnan, N. G. Faith, B. Cauvin, G. Baccus-Taylor, K. Arihara, B. Bater, A. J. Maurer y R. G. Cassens.** 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3053–3059.
- Lunden, J., R. Tolvanen y H. Korkeala.** 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J. Dairy Sci.* 87: E6–E12.
- Lücke, F.-K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56: 105–115.
- Lüders, T., G. A. Birkemo, G. Fimland, J. Nilssen-Meyer e I. F. Nes.** 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1797–1799.
- Lyhs, U.** 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, Finlandia.
- Lyhs, U. y J. Björkroth.** 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.* 25: 529–533.
- Lyhs, U., J. Björkroth y H. Korkeala.** 1999. Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 77–84.
- Lyhs, U., H. Korkeala, P. Vandamme y J. Björkroth.** 2001. *Lactobacillus alimentarius*—a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 355–360.
- Lyhs, U., H. Korkeala y J. Björkroth.** 2002. Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 147–153.
- Lyra, A., S. Lahtinen y A. C. Ouwehand.** 2012. Gastrointestinal benefits of probiotics—clinical evidence. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 509–524, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Mackay, A. D., M. B. Taylor, C. C. Kibbler y J. M. T. Hamilton-Miller.** 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect.* 5: 290–292.
- Maddison, A., K. Machel y L. Adams.** 1999. Procesamiento del pescado. Intermediate Technology Development Group, Lima, Perú.
- Maischberger, T., I. Mierau, C. K. Peterbauer, J. Hugenholtz y D. Haltrich.** 2010. High-level expression of *Lactobacillus* beta-galactosidases in *Lactococcus lactis* using the food-grade, nisin-controlled expression system NICE. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2279–2287.
- Maisnier-Patin, S., N. Deschamps, S. R. Tatini y J. Richard.** 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72: 249–263.
- Majhenič, A. Č., K. Venema, G. E. Allison, B. B. Matijasić, I. Rogelj y T. R. Klaenhammer.** 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 705–714.
- Majhenič, A. Č., I. Rogelj y B. Perko.** 2005. Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food. Microbiol.* 102: 239–244.
- Makaryus, A. N., R. Yang, R. T. Hahn y S. Kort.** 2005. A rare case of *Lactobacillus acidophilus* presenting as mitral valve bacterial endocarditis. *Echocardiography* 22: 421–425.

- Makino, S., K. Kawamoto, K. Takeshi, Y. Okada, M. Yamasaki, S. Yamamoto y S. Igimi.** 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 189–196.
- Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60: 512–538.
- Maldonado, A., J. L. Ruiz-Barba y R. Jimenez-Diaz.** 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 383–389.
- Maldonado-Galeano, C., A. de Moreno de LeBlanc, C. Dogi y G. Perdigón.** 2010. Lactic acid bacteria as immunomodulators of the gut-associated immune system. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 125–140, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Manero, A. y A. R. Blanch.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425–4430.
- Mañes-Lázaro, R., J. Song, I. Pardo, J. C. Cho y S. Ferrer.** 2009. *Lactobacillus aquaticus* sp. nov., isolated from a Korean freshwater pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2215–2218.
- Mantovani, H. C. y J. B. Russell.** 2002. The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen. *Anaerobe* 8: 247–252.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).** 2007. Plan Estratégico Nacional del Fondo Europeo de Pesca. España.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, I. Guerra y E. Valdivia.** 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 148–151.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. J. Sánchez-Barrena, C. González, A. Albert, M. Rico y E. Valdivia.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 399–416.
- Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia y M. Martínez Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 2–22.
- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro y A. Montoya.** 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303: 92–104.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).** 2007. Libro Blanco de la Pesca. España.
- MARM.** 2009. Plan Estratégico Nacional del Fondo Europeo de la Pesca. España.
- MARM.** 2011a. Programa Operativo para el Sector Pesquero Español. Fondo Europeo de Pesca 2007–2009. España.
- MARM.** 2011b. Actualización del Plan Estratégico Nacional del Fondo Europeo de Pesca 2007–2013. España.
- Marothi, Y. A., H. Agnihotri y D. Dubey.** 2005. Enterococcal resistance: an overview. *Indian J. Med. Microbiol.* 23: 214–219.
- Martín Cerdeño, V. J.** 2008. Consumo y gasto en pescado. *Distribución y Consumo* 101: 32–44.
- Martín Cerdeño, V. J.** 2010. Consumo de pescado en España. *Distribución y Consumo* 113: 5–22.
- Martín, M.** 2006. Identificación y evaluación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas y detección de factores potenciales de virulencia de enterococos aislados de palomas torcaces (*Columba palumbus*). Caracterización bioquímica y genética de la columbicina A de *Enterococcus columbae* PLCH2 y construcción de quimeras génicas que permiten la producción y expresión funcional de la enterocina A y la pediocina PA-1 y su coproducción con la nisina A en cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

- Martín, M. C., J. C. Alonso, J. E. Suárez y M. A. Álvarez.** 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2599–2604.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007a. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 667–675.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007b. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.* 70: 2792–2798.
- Martín, R.** 2005. Origen y potencial probiótico de la microbiota de la leche humana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martínez, J. M.** 2000. Producción y empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martínez, J. M., M. I. Martínez, A. M. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández.** 1998. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4536–4545.
- Martínez, J. M., M. I. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez, M. F. Fernández, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández.** 1999. Antibodies to a synthetic 1-9-N-terminal amino acid fragment of mature pediocin PA-1: sensitivity and specificity for pediocin PA-1 and cross-reactivity against class IIa bacteriocins. *Microbiology* 145: 2777–2787.
- Martínez, B., A. Rodríguez y J. E. Suárez.** 2000a. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology* 146: 949–955.
- Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders y P. E. Hernández.** 2000b. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3543–3549.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000c. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 1. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria* 314: 59–66.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000d. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 2. Modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. *Alimentaria* 314: 67–74.
- Martínez-Álvarez, O., A. J. Borderías y M. C. Gómez-Guillén.** 2005. Bacalao salado: historia y procesado. *Alimentación, equipos y tecnología* Año nº 24, 197: 70–84.
- Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Coyette y E. Valdivia.** 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 176: 6334–6339.
- Martínez-Cuesta, M. C., J. Kok, E. Herranz, C. Peláez, T. Requena y G. Buist.** 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3174–3179.
- Martínez-Cuesta, M. C., T. Requena y C. Peláez.** 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 79–88.
- Martín-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Ruiz-Rodríguez, J. J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4245–4249.
- Marty, E., J. Buchs, E. Eugster-Meier, C. Lacroix y L. Meile.** 2012. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiol.* 29: 157–166.
- Marugg, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenbergh.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in

production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2360–2367.

Mathiesen, G., K. Gene, L. Kroeckel, L. Axelsson y V. G. H. Eijsink. 2005. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translation coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3565–74.

Mathiesen, G., A. Sveen, J. C. Piard, L. Axelsson y V. G. H. Eijsink. 2008. Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105: 215–226.

Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 1–10.

Mauguin, S. y G. Novel. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *J. Appl. Microbiol.* 76: 616–625.

McAuliffe, O., C. Hill y R. P. Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 86: 251–256.

McCormick, J. K., R. W. Worobo y M. E. Stiles. 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4095–4099.

McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, K. L. Roy, L. M. McMullen, J. C. Vederas, M. E. Stiles y M. J. van Belkum. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4757–4766.

McLay, R. 1972. Marinades. *Torry Advisory Note No. 56*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido.

McLeod, A., M. Zagorec, M. C. Champomier-Verges, K. Naterstad y L. Axelsson. 2010. Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. *BMC Microbiol.* 10: 120.

McMullen, L. M. y M. E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot. (Suppl.)*: 64–71.

Mediavilla, A. 2004. Antibióticos glucopéptidos. Oxazolidinonas. Estreptograminas. En: “*Farmacología humana*”, pp. 1141–1148, 4ª edición. Flórez, J., J. A. Armijo y A. Mediavilla. (eds.). Masson S. A., Barcelona, España.

Melo, M. N., R. Ferre y M. A. Castanho. 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 245–250.

Merrifield, D. y Z. Zhou. 2011. Probiotic and prebiotic applications in aquaculture. *J. Aquac. Res. Development* S1: e001.

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bøgwald, M. Castex y E. Ringø. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302: 1–18.

Messaoudi, S., G. Kergourlay, M. Dalgalarrrondo, Y. Choiset, M. Ferchichi, H. Prévost, M. F. Pilet, J. M. Chobert, M. Manai y X. Dousset. 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* 32: 129–134.

Messens, W. y L. de Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 31–43.

Messens, W., J. Verluyten, F. Leroy y L. de Vuyst. 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41–52.

Meurman, J. H. e I. Stamatova. 2012. Lactic acid bacteria in oral health. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 403–422, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

- Michel, C., C. Pelletier, M. Boussaha, D. G. Douet, A. Lautraite y P. TAILLEZ. 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2947–2955.
- Michel-Briand, Y. y C. Baysse. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84: 499–510.
- Mierau, I. y M. Kleerebezem. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 705–717.
- Mierau, I., P. Leji, I. van Swam, B. Blommestein, E. Floris, J. Mond y E. J. Smid. 2005a. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4:15.
- Mierau, I., K. Olieman, J. Mond y E. J. Smid. 2005b. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb. Cell Fact.* 4:16.
- Miettinen, H. 2006. *Listeria monocytogenes* in fish farming and processing. Academic dissertation. Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Miettinen, M. K., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. J. Bjorkroth y H. J. Korkeala. 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2358–2360.
- Miller, K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu y B. Ray. 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1997–2005.
- Miller, W. L. y G. Reid. 2012. Human studies on probiotics and endogenous lactic acid bacteria in the urogenital tract. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 543–560, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault y M. Lacroix. 2008. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1997–2003.
- Modi, K. D., M. L. Chikindas y T. J. Montville. 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 249–253.
- Mofredj, A., H. Bahloul y C. Chanut. 2007. *Lactococcus lactis*: an opportunistic bacterium? *Med. Mal. Infect.* 37: 200–207.
- Mogensen, G., S. Salminen, J. O’Brien, A. Ouwehand, W. Holzapfel, C. Shortt, R. Fondén, G. D. Miller, D. Donohue, M. Playne, R. Crittenden y B. Bianchi Salvadori. 2002. Food microorganisms—health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bull. IDF* 377: 4–9.
- Moll, G. N., W. N. Konings y A. J. M. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185–198.
- Montalbán-López, M., M. Sánchez-Hidalgo, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno y M. Maqueda. 2011. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12: 1205–1220.
- Montville, T. J. y M. E. C. Bruno. 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 53–74.
- Montville, T. J. e Y. Chen. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 511–519.
- Morales, P., A. I. Haza, Y. Ikken, A. Martínez, B. Sanz y P. E. Hernández. 1996. Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 15: 139–147.
- Moreira, W. L. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Morelli, L., M. L. Calleagri, F. K. Vogensen y A. A. von Wright. 2012. Genetics of Lactic Acid Bacteria. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 17–37, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

- Morello, E., L. G. Bermúdez-Humarán, D. Llull, V. Solé, N. Miraglio, P. Langella y I. Poquet. 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 48–58.
- Moreno Páramo, A. y L. Abad Casal. 1978. Aportaciones al estudio de la pesca en la antigüedad. *Habis* 2: 209–221.
- Moreno, M. R. F., J. J. Leisner, L. K. Tee, C. Ley, S. Radu, G. Rusul, M. Vancanneyt y L. de Vuyst. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 147–157.
- Møretrø, T., K. Naterstad, E. Wang, I. M. Aasen, S. Chaillou, M. Zagorec y L. Axelsson. 2005. Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156: 949–960.
- Møretrø, T., I. M. Aasen, I. Storro y L. Axelsson. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88: 536–545.
- Morgan, S. M., M. Galvin, R. P. Ross y C. Hill. 2001. Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 387–391.
- Mori, H. y K. Ito. 2001. The Sec protein-translocation Pathway. *Trends Microbiol.* 9: 494–500.
- Morrison, D., N. Woodford y B. Cookon. 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol.* 83: 89S–99S.
- Mortvedt, C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten e I. F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1829–1834.
- Moudden, M. K., A. Boukhira, D. Sarret, G. Cazajous, J. Labaye, M. Herody, C. Soler y F. Didelot. 2007. Septicaemia due to *Lactobacillus jensenii*: bacteriological diagnostical orientation. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 65: 299–302.
- Mtshali, P. S., B. Divol y M. du Toit. 2012. Identification and characterization of *Lactobacillus florum* strains isolated from South African grape and wine samples. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 106–113.
- Mulet-Powell, N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Viñas y M. S. de Buochberg. 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61: 1210–1212.
- Munro, P. D., A. Barbour y T. H. Birkbeck. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4425–4428.
- Muñoz-Atienza, E., G. Landeta, B. de la Rivas, B. Gómez-Sala, R. Muñoz, P. E. Hernández, L. M. Cintas y C. Herranz. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 212–216.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. del Campo, P. E. Hernández, C. Herranz y L. M. Cintas. 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 13: 15
- Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 553–560.
- Muus, B. J. y P. Dahlström. 1971. Guía de los peces de mar del Atlántico y del Mediterráneo. Pesca, biología, importancia económica. Ed. Omega S. A. Barcelona, España.
- Nagao, J., S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama y K. Sonomoto. 2006. Lantibiotics: insight and foresight for the new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 139–149.
- Naghmouchi, K., E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss. 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 24: 718–727.

- Nair, P. S. y P. K. Surendran. 2005. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isoalted from fish and prawn. *J. Cult. Collect.* 4: 48–52.
- Najjari, A., H. Ouzari, A. Boudabous y M. Zagorec. 2008. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 342–351.
- Nandiwada, L. S., G. P. Schamberger, H. W. Schafer y F. Diez-Gonzalez. 2004. Characterization of an E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 267–279.
- Naruse, N., O. Tenmyo, K. Tomita, M. Konishi, T. Miyaki, H. Kawaguchi, K. Fukase, T. Wakamiya y T. Shiba. 1989. Lanthiopeptin, a new peptide antibiotic. Production, isolation and properties of lanthiopeptin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 42: 837–845.
- Natale, P., T. Brügger y A. J. Driessen. 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1735–1756.
- Natrah, F. M., T. Defoirdt, P. Sorgeloos y P. Bossier. 2011. Disruption of bacterial cell-to cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol. (NY)* 13: 109–126.
- Naude, W. D., A. Swanepoel, R. H. Bohmer y E. Bolding. 1988. Endocarditis caused by *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus*. A case report. *S. Afr. Med. J.* 73: 612–614.
- Navarro, L., M. Zarazaga, J. Sáenz, F. Ruiz-Larrea y C. Torres. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44–51.
- Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 2–14.
- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faid y A. Bouseta. 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 295–310.
- Neef, P. A., H. Polenakovik, J. E. Clarridge, M. Saklayan, L. Bogard y J. M. Bernstein. 2003. *Lactobacillus paracasei* continuous ambulatory peritoneal dialysis-related peritonitis and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2783–2784.
- Neetoo, H., M. Ye y H. Chen. 2007. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 70: 1267–1271.
- Nes, I. F. y V. G. H. Eijsink. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. En: “*Cell-Cell Signaling in Bacteria*”, pp. 175–192. Dunny, G. M. y S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU.
- Nes, I. F. y H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 55: 50–61.
- Nes, I. F. y O. Johnsborg. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 100–104.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 81–115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Nes, I. F., D. B. Diep y H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Nes, I. F., M. Kjos y D. B. Diep. 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 285–329, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

- Nettles, C. G. y S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338–356.
- Netz, D. J. A., H.-G. Sahl, R. Marcolino, J. dos Santos-Nascimento, S. S. de Oliveira, M. B. Soares y M. C. F. Bastos. 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311: 939–949.
- Netz, D. J. A., R. Pohl, A. G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A. J. Pierik, M. C. F. Bastos y H.-G. Sahl. 2002. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319: 745–756.
- Neu, T. y B. Henrich. 2003. New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin-controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1377–1382.
- Neysens, P., W. Messens, D. Gevers, J. Swings y L. de Vuyst. 2003. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. *Microbiology* 149: 1073–1082.
- Nguyen, H. A., T. Tomita, M. Hirota, J. Kaneko, T. Hayashi e Y. Kamio. 2001. DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *J. Bacteriol.* 183: 6274–6281.
- Nguyen, T. D. T., J. H. Kang y M. S. Lee. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 358–361.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180: 1848–1854.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2975–2984.
- Nilsson, L., H. H. Huss y L. Gram. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 217–227.
- Nilsson, L., L. Gram y H. H. Huss. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62: 336–342.
- Nilsson, L., Y. Y. Ng, J. N. Christiansen, B. L. Jørgensen, D. Gróttun y L. Gram. 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96: 133–143.
- Nilsson, L., T. B. Hansen, P. Garrido, C. Buchrieser, P. Glaser, S. Knöchel, L. Gram y A. Gravesen. 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 172–183.
- Nishie, M., J.-I. Nagao y K. Sonomoto. 2012. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17: 1–16.
- Nissen-Meyer, J. e I. F. Nes. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167: 67–77.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Håvarstein, K. Sletten e I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686–5692.
- Nissen-Meyer, J., L. A. G. Granly, K. Sletten, M. Daeschel e I. F. Nes. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1973–1978.
- Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegård, H. S. Haugen y P. E. Kristiansen. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10:19–37.
- Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H. S. Hauguen y P. E. Kristiansen. 2010. Structure and mode of action of the two-peptide (Class IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicro. Proteins* 2: 52–60.

- Nouaille, S., L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella y V. Azevedo. 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 2: 102–111.
- Núñez, M., J. L. Rodríguez, E. García, P. Gaya y M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671–677.
- Nyquist, O. L., A. McLeod, D. A. Brede, L. Snipen, Å. Aakra e I. F. Nes. 2011. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* with emphasis on strains from meat. *Mol. Genet. Genomics* 285: 297–311.
- Nørrung, B., J. K. Andersen y J. Schlundt. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 195–203.
- O'Brien, J., R. Crittenden, A. C. Ouwehand y S. Salminen. 1999. Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 418–424.
- O'Connor, E. M. y R. F. Shand. 2002. Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 23–31.
- O'Connor, E. B., B. O'Riordan, S. M. Morgan, H. Whelton, D. M. O'Mullane, R. P. Ross y C. Hill. 2006. A lactacin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1251–1260.
- O'Connor, S., R. Ono y C. Clarkson. 2011. Pelagic fishing at 42,000 years before the present and the maritime skills of modern humans. *Science* 334: 1117–1121.
- O'Keeffe, T. y C. Hill. 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- O'Keeffe, T., C. Hill y R. P. Ross. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1506–1515.
- O'Mahony, A., T. O'Sullivan, Y. Walsh, A. Vaughan, M. Maher, G. F. Fitzgerald y D. van Sinderen. 2000. Characterization of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley. *J. Inst. Brew.* 106: 403–410.
- O'Mahony, T., N. Rekhif, C. Cavadini, y G. F. Fitzgerald. 2001. The application of a fermented food ingredient containing ‘variacin’, a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 90: 106–114.
- O'Shea, E. F., P. M. O'Connor, E. J. Raftis, P. W. O'Toole, C. Stanton, P. D. Cotter, R. P. Ross y C. Hill. 2011. Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. *J. Bacteriol.* 193: 6973–6982.
- O'Sullivan, L., R. P. Ross y C. Hill. 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- O'Sullivan, L., S. M. Morgan, R. P. Ross y C. Hill. 2002b. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lactacin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.* 85: 2130–2140.
- Ocaña, V. S., A. A. Pesce De Ruiz Holgado y M. E. Nader-Macías. 1999. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5631–5635.
- Ogier, J.-C. y P. Serror. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291–301.
- Ogier, J.-C., E. Casalta, C. Farrokh y A. Saïhi. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286–290.
- Ogunshe, A. A. O. y O. P. Olabode. 2009. Antimicrobial potentials of indigenous *Lactobacillus* strains on gram-negative indicator bacterial species from *Clarias gariepinus* (Burchell.) microbial inhibition of fish-borne pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3: 870–876.

- Oh, S., H. Roh, H. J. Ko, S. Kim, K. H. Kim, S. E. Lee, I. S. Chang, S. Kim e I. G. Choi. 2011. Complete genome sequencing of *Lactobacillus acidophilus* 30SC, isolated from swine intestine. *J. Bacteriol.* 193: 2882–2883.
- Ojcus, D. M. y J. D. Young. 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem. Sci.* 16: 225–229.
- Ólafsdóttir, G., E. Martinsdóttir, J. Oehlenschläger, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I. M. Mackie, G. Henahan, J. Nielsen y H. Nilsen. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 258–265.
- Ólafsdóttir, G., P. Nesvadba, C. Di Natale, M. Careche, J. Oehlenschläger, S. V. Tryggvadóttir, R. Schubring, M. Kroeger, K. Heia, M. Esaiassen, A. Macagnano y B. M. Jørgensen. 2004. Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 86–93.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, C. M. A. P. Franz y W. H. Holzapfel. 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from “wara”-a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 438–441.
- Olempska-Beer, Z. S., R. I. Merker, M. D. Ditto y M. J. Di Novi. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45: 144–158.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2003. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Serie de Informes Técnicos 916. OMS, Ginebra, Suiza.
- Onarheim, A. M., R. Wiik, J. Burghardt y E. Stackebrandt. 1994. Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 370–379.
- Oppegård, C., P. R. Linda-Emanuelson, P. E. Kristiansen, G. Fimland y J. Nissen-Meyer. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210–219.
- Orla-Jensen, S. 1919. En: “*The Lactic Acid Bacteria*”, pp. 1–196. Orla-Jensen, S. (Ed.). Høst, Copenhagen, Dinamarca.
- Oscáriz, J. C. y A. G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4: 13–19.
- Oumer, A., P. Gaya, E. Fernández-García, R. Marciana, S. Garde, M. Medina y M. Núñez. 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68: 117–129.
- Ouwehand, A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 139–160, 2ª edición. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Ouwehand, A. C. y S. Salminen. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749–758.
- Ouwehand, A. C., S. Salminen y E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279–289.
- Østergaard, A., P. K. B. Embarek, C. Wedell-Neergaard, H. H. Huss y L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiol.* 15: 223–233.
- Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka y R. E. Dalbey. 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102: 4549–4580.
- Pag, U. y H.-G. Sahl. 2002a. Lanthionine-containing bacterial peptides. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 47–80. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Pag, U. y H.-G. Sahl. 2002b. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* 8: 815–833.

- Panigrahi, A. e I. S. Azad.** 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 429–440.
- Papagianni, M.** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21: 465–499.
- Papathanasopoulos, M. A., F. Krier, A. M. Revol-Junelles, G. Lefebvre, J. P. Le Caer, A. von Holy y J. W. Hastings.** 1997. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains. *Curr. Microbiol.* 35: 331–335.
- Parente, E. y C. Hill.** 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55: 497–502.
- Parente, E. y A. Ricciardi.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628–638.
- Parente, E., C. Brienza, A. Ricciardi y G. Addario.** 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 62–67.
- Park, K.-Y y B. K. Kim.** 2012. Lactic Acid Bacteria in vegetable fermentations. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 187–211, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Parret, A. y R. de Mot.** 2000. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 35: 472–473.
- Pascual-Anderson, M. R. y V. Calderón y Pascual.** 2000. Microbiología alimentaria. En: “*Metodología analítica para alimentos y bebidas*”, 2ª edición. Díaz de Santos, S. A. (Ed.). Madrid, España.
- Pauly, D.** 2004. Much rowing for fish. *Nature.* 432: 813–814.
- Pavia, M., C. G. Nobile, L. Salpietro e I. F. Angelillo.** 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63: 912–915.
- Peláez, C. y T. Requena.** 2005. Exploiting the potential of bacteria in cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15: 831–844.
- Pérez, N.** 2012. A review on some chemical engineering and microbiological aspects considered in the production of highly concentrated probiotic cultures and bacteriocins by lactococci and lactobacilli. *ISRN Chemical Engineering* Article ID 836381 doi:10.5402/2012/836381
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield y I. Ruiz-Zarzuela.** 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 34: 499–507.
- Petersen, A. y A. Dalsgaard.** 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ. Microbiol.* 5: 395–402.
- Pfeiler, E. A. y T. R. Klaenhammer.** 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends. Microbiol.* 15: 546–553.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525–541.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 72: 113–142.
- Pinto, A. L., M. Fernandes, C. Pinto, H. Albano, F. Castilho, P. Teixeira y P. A. Gibbs.** 2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 50–58.
- Plano, G. V., J. B. Day y F. Ferracci.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.* 40: 284–293.
- Plant, K. P. y S. E. LaPatra.** 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 1256–1262.
- Platteuw, C., I. van Alen-Boerrigter, S. van Schalkwijk y W. M. de Vos.** 1996. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1008–1013.

- Poeta, P., D. Costa, B. Rojo-Bezares, M. Zarazaga, N. Klibi, J. Rodrigues y C. Torres. 2007. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol. Res.* 162: 257–263.
- Pons, A.-M., I. Lanneluc, G. Cottenceau y S. Sable. 2002. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84: 531–537.
- Pons, S. 2005. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, España.
- Pope, J. G. y C. T. Macer. 1996. An evaluation of the stock structure of North Sea cod, haddock, and whiting since 1920, together with consideration of the impacts of fisheries and predation effects on their biomass and recruitment. *ICES J. Mar. Sci.* 53: 1157–1169.
- Pot, B. y E. Tsakalidou. 2009. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. En: “*Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*”, pp. 3–58. Ljungh, A. y T. Wadström (eds.). Caister Academic Press, Norfolk, VA, EE.UU.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters y K. H. Schleifer. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications*”, pp. 13–90. de Vuyst L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Reino Unido.
- Pouwels, P. H., R. J. Leer, M. Shaw, M.-J. H. den Bak-Glashouwer, F. D. Tielen, E. Smit, B. Martínez, J. Jore y P. L. Conway. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 155–167.
- Poyart, C., G. Quesnes y P. Trieu-Cuot. 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 415–418.
- Pridmore, D. R., B. Berger, F. Desiere, D. Vilanova, C. Barretto, A.-C. Pittet, M.-C. Zwahlen, M. Rouvet, E. Altermann, R. Barrangou, B. Mollet, A. Mercenier, T. Klaenhammer, F. Arigoni y M. A. Schell. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Microbiology* 101: 2512–2517.
- Prins, W. A., M. Botha, M. Botes, M. de Kwaadsteniet, A. Endo y L. M. T. Dicks. 2010. *Lactobacillus plantarum* 24, isolated from the marula fruit (*Sclerocarya birrea*), has probiotic properties and harbors genes encoding the production of three bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 61: 584–589.
- Priault, G., C. Turcotte, L. Labarre, C. Lacroix e I. Fliss. 2000. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* 10: 627–633.
- Psoni, L., N. Tzanetakis y E. Litopoulou-Tzanetaki. 2003. Microbial characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.* 20: 575–582.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50–108.
- Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg y J. J. Mekalanos. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1528–1533.
- Quadri, L. E. N. 2002. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 133–145.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269: 12204–12211.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terebiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177: 1144–1151.
- Quadri, L. E. N., L. Z. Yan, M. E. Stiles y J. C. Vederas. 1997a. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272: 3384–3388.

- Quadri, L. E. N., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1997b. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163–6171.
- Quigg, A., L. Broach, W. Denton y R. Miranda.** 2009. Water quality in the Dickinson Bayou watershed (Texas, Gulf of Mexico) and health issues. *Mar. Pollut. Bull.* 58: 896–904.
- Quigley, L., O. O’Sullivan, T. P. Beresfors, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald y P. D. Cotter.** 2011. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150: 81–94.
- Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura y J. W. Hastings.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3098–3101.
- Ramnath, M., S. Arous, A. Gravesen, J. W. Hastings e Y. Héchard.** 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150: 2663–2668.
- Rankin, D. J., E. P. Rocha y S. P. Brown.** 2011. What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity (Edinb.)* 106: 1–10.
- Rantsiou, K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi y L. Cocolin.** 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1977–1986.
- Rao, A. V., A. C. Bested, T. M. Beaulne, M. A. Katzman, C. Iorio, J. M. Berardi y A. C. Logan.** 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog.* 1: 6.
- Rasch, M. y S. Knøchel.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 275–278.
- Rau, C.** 1884. Prehistoric fishing in Europe and North America. Contributions to Knowledge 25. Smithsonian Institution, Washington DC, EE.UU.
- Rautio, M., H. Jousimies-Somer, H. Kauma, I. Pietarinen, M. Saxelin, S. Tynkkynen y M. Koskela.** 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1159–1160.
- Ray, B., R. Schamber y K. W. Miller.** 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2281–2286.
- Rayman, M. K., B. Aris y A. Hurst.** 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 375–380.
- Reddy, K. V., C. Aranha, S. M. Gupta y R. D. Yedery.** 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. *Reproduction* 128: 117–126.
- Reid, F. L., K. A. Ahmed, W. M. Waites y G. S. A. B. Stewart.** 1990. The rapid detection of antimicrobials using bioluminescent lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: P88.
- Reinitz, G.** 1983. Relative effect of age, diet, and feeding ratio in the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35: 19–27.
- Reinitz, G. L., L. E. Onne y F. N. Hitzel.** 1979. Variations of body composition and growth among strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Trans. Am. Fish. Soc.* 108: 204–207.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* 28: 237–241.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre.** 1995. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 349–358.

- Remiger, A., V. G. Eijssink, M. A. Ehrmann, K. Sletten, I. F. Nes y R. F. Vogel.** 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 α and 1.25 β , two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *J. Appl. Microbiol.* 86: 1053–1058.
- Revol-Junelles, A. M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour y G. Lefebvre.** 1996. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 120–124.
- Rice, E. W., J. W. Messer, C. H. Johnson y D. J. Reasoner.** 1995. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 374–376.
- Richard, C., A. Brillet, M. F. Pilet, H. Prevost y D. Drider.** 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 288–292.
- Richard, C., D. Drider, I. Fliss, S. Denery y H. Prévost.** 2004. Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 248–254.
- Richard, C., R. Cañon, K. Naghmouchi, D. Bertrand, H. Prévost y D. Drider.** 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23: 175–183.
- Richards, G. P., M. A. Watson, E. J. Cran 3rd, I. G. Burt y D. Bushek.** 2008. *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in oysters and seawater from the Delaware Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3323–3327.
- Rigoulay, C., I. Poquet, S. M. Madsen y A. Gruss.** 2004. Expression of the *Staphylococcus aureus* surface proteins HtrA1 and HtrA2 in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 279–288.
- Rihakova, J., V. W. Petit, K. Demnerova, H. Prevost, S. Rebuffat y D. Drider.** 2009. Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1811–1819.
- Riley, M. A. y J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117–137.
- Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J.-P. Le Pennec y D. Haras.** 1997. Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4252–4260.
- Ringø, E.** 2004. Lactic acid bacteria in fish and fish farming. En: “*Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*”, pp. 581–610. Salminen, S., A. Ouwehand y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Ringø, E.** 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquac. Res.* 39: 171–180.
- Ringø, E. y E. Strøm.** 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquacult. Fish Manage.* 25: 623–629.
- Ringø, E. y F. J. Gatesoupe.** 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177–203.
- Ringø, E. y W. Holzapfel.** 2000. Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 523–527.
- Ringø, E., E. Strom y J. A. Tabachek.** 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquacult. Res.* 26: 773–789.
- Ringø, E., H. R. Bendiksen, S. J. Gausen, A. Sundsfjord y R. E. Olsen.** 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Appl. Microbiol.* 85: 855–864.
- Ringø, E., H. R. Bendiksen, M. S. Wesmajervi, R. E. Olsen, P. A. Jansen y H. Mikkelsen.** 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Appl. Microbiol.* 89: 317–322.

- Ringø, E., M. S. Wesmajervi, H. R. Bendiksen, A. Berg, R. E. Olsen, T. Johnsen, H. Mikkelsen, M. Seppola, E. Strøm y W. Holzapfel. 2001. Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine. *System. Appl. Microbiol.* 24: 183–191.
- Ringø, E., R. Myklebust, T. M. Mayhew y R. E. Olsen. 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268: 251–264.
- Ringø, E., U. Schillinger y W. Holzapfel. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. En: “*Microbial Ecology in Growing Animals*”, pp. 418–453. Holzapfel, W. H., P. J. Naughton, S. G. Pierzynowski, R. Zabielski y E. Salek (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, Londres, Reino Unido.
- Ringø, E., S. Sperstad, R. Myklebust, S. Refstie y A. Krogh. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261: 829–841.
- Ringø, E., L. Løvmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R. E. Olsen y T. M. Mayhew. 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquacul. Res.* 41: 451–467.
- Risøen, P. A., L. S. Håvarstein, D. B. Diep e I. F. Nes. 1998. Identification of the DNA-binding sites of two response regulators involved in control of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.* 259: 224–232.
- Risøen, P. A., M. B. Brurberg, V. G. H. Eijsink e I. F. Nes. 2000. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 37: 619–628.
- Roberts, C. 2007. The unnatural history of the sea: the past and the future of humanity and fishing. Gaia Thinking Publishing, Londres, Reino Unido.
- Robichon, D., E. Guin, M. Débarbouillé, P. Cossart, Y. Cenatiempo e Y. Héchard. 1997. The *rpoN* (σ_{54}) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7591–7594.
- Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7: 192–202.
- Rocourt, J., C. Jacquet y A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 197–209.
- Rocourt, J., A. Hogue, H. Toyofuku, C. Jacquet y J. Schlundt. 2001. *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am. J. Infect. Control* 29: 225–227.
- Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 276–284.
- Rodgers, S., K. Kailasapathy, J. Cox y P. Peiris. 2002. Bacteriocin production by protective cultures. *Food Service Technol.* 2: 59–68.
- Rodríguez, E., B. González, P. Gaya, M. Nuñez y M. Medina. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10: 7–15.
- Rodríguez, E., J. L. Arques, M. Nuñez, P. Gaya y M. Medina. 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* 0157: H7 in raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3399–3404.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, P. Poeta, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea y C. Torres. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 234–240.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, M. Zarazaga, C. Torres y F. Ruiz-Larrea. 2007a. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 32–36.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, L. Navarro, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea y C. Torres. 2007b. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol.* 24: 482–491.

- Romero, M., R. Avendaño-Herrera, B. Magariños, M. Cámara y A. Otero.** 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFC) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131–139.
- Rose, G.** 2007. The ecological history of the North Atlantic fisheries. Breakwater Books, St. John's, NL, Canadá.
- Rose, N. L., P. Sporns y L. M. McMullen.** 1999. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2238–2242.
- Rose, N. L., P. Sporns y L. M. McMullen.** 2001. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* 13: 225–239.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337–346.
- Ross, R. P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Ross, R. P., P. Sporns, H. M. Dodd, M. J. Gasson, F. A. Mellon y L. M. McMullen.** 2003. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3174–3178.
- Ruiz-Barba, J. L., D. P. Cathcart, P. J. Warner y R. Jiménez-Díaz.** 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2059–2064.
- Ruiz-Moyano, S., A. Martín, M. J., Benito, A. Hernández, R. Casquete y M. G. Córdoba.** 2011. Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 28: 839–847.
- Rusch, S. L. y D. A. Kendall.** 2007. Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochim Biophys Acta* 1768: 5–12.
- Russell, J. B y H. C. Mantovani.** 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 347–355.
- Ryan, M. P., M. C. Rea, C. Hill y R. P. Ross.** 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612–619.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross y C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2287–2290.
- Ryan, M. P., J. Flynn, C. Hill, R. P. Ross y W. J. Meaney.** 1999. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 2625–2631.
- Ryan, M. P., R. P. Ross y C. Hill.** 2001. Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lacticin 3147-producing and -resistant cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2699–2704.
- Ryan, M. P., C. Hill y R. P. Ross.** 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 193–242. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Rørvik, L. M.** 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 183–190.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö y T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197–215.
- Saavedra, L., P. Castellano y F. Sesma.** 2004. Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Methods Mol. Biol.* 268: 331–336.
- Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme.** 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 68: 21–60.
- Sahl, H.-G. y G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41–79.

- Sahrhage, D. y J. Lundbeck.** 1992. A history of fishing. Springer Verlag, Berlín, Alemania.
- Saithong, P., W. Panthavee, M. Boonyaratanakornkit y C. Sikkhamondhol.** 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in pla-som, a Thai fermented fish. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 553–557.
- Saito, T., K. Arai y M. Matsuyoshi.** 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 24:749–752.
- Sakamoto, K. y W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.
- Salminen, S. y A. von Wright.** 2012. Probiotics: safety and efficacy. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 509–524, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 347–358.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland y T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93–106.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno e Y. K. Lee.** 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10: 107–110.
- Salminen, M. K., S. Tynkkynen, H. Rautelin, M. Saxelin, M. Vaara, P. Ruutu, S. Sarna, V. Valtonen y A. Järvinen.** 2002. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1155–1160.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen y A. Jarvinen.** 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.* 42: e35–c44.
- Salovaara, H. y M. Gänzle.** 2012. Lactic acid bacteria in cereal-based products. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 227–245, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Samelis, J., S. Roller y J. Metaxopoulos.** 1994. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 475–486.
- Samelis, J., A. Kakouri y J. Rementzis.** 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.* 17: 329–340.
- Sánchez, F., N. Pérez y J. Landa.** 1998. Distribution and abundance of megrim (*Lepidorhombus boschii* and *Lepidorhombus whiffiagonis*) on the northern Spanish shelf. *ICES J. Mar. Sci.* 55: 494–514.
- Sánchez, J.** 2008. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007a. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227–236.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117: 295–305.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2008. Cloning and heterologous production of Hiracin JM79, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2471–2479.

- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1633–1641.
- Sanders, M. E.** 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61: 91–99.
- Sanders, M. E., L. M. Akkermans, D. Haller, C. Hammerman, J. Heimbach, G. Hörmannspurger, G. Huys, D. D. Levy, F. Lutgendorff, D. Mack, P. Phothirath, G. Solano-Aguilar y E. Vaughan.** 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 1: 164–185.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Sarantinopoulos, P., F. Leroy, E. Leontopoulou, M. D. Georgalaki, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou y L. de Vuyst.** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 125–136.
- Saucier, L., A. S. Paradkar, L. S. Frost, S. E. Jensen y M. E. Stiles** 1997. Transcriptional analysis and regulation of carnobacteriocin production in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Gene* 188: 271–277.
- Saxelin, M., N.-H. Chuang, B. Chassy, H. Rautelin, P. H. Mäkelä, S. Salminen y S. L. Gorbach.** 1996. Lactobacilli and bacteremia in Southern Finland, 1989–1992. *Clin. Infect. Dis.* 22: 564–566.
- SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition).** 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General; Directorate C–Scientific Opinions, 18 Abril.
- Scannell, A. G. M., R. P. Ross, C. Hill y E. K. Arendt.** 2000a. An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. *J. Food Prot.* 63: 370–375.
- Scannell, A. G. M., C. Hill, R. P. Ross, S. Marx, W. Hartmeier y E. K. Arendt.** 2000b. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin®. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 241–249.
- Scearce, C.** 2009. European fisheries history: pre-industrial origins of overfishing. *ProQuest Discovery Guides*. www.csa.com
- Schillinger, U. y F. K. Lücke.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
- Schillinger, U., M. Kaya y F. K. Lucke.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 473–478.
- Schillinger, U., R. Geisen y W. H. Holzapfel.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158–164.
- Schirrmeister, J. F., A. L. Liebenow, K. Pelz, A. Wittmer, A. Serr, E. Hellwig y A. Al-Ahmad.** 2009. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J. Endod.* 35: 169–174.
- Schleifer, K. H. y W. Ludwig.** 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* 18: 461–467.
- Schneider, E. y S. Hunke.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 1–20.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks e I. S. Pretorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647–656.
- Seifert, J. y G. Mogensen.** 2002. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. IDF* 377: 10–19.

- Semedo, T., M. Almeida Santos, P. Martins, M. F. Silva Lopes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro y M. T. Barreto Crespo. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2569–2576.
- Seppola, M., R. E. Olsen, E. Sandaker, P. Kanapathipillai, W. Holzapfel y E. Ringø. 2006. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 131–137.
- Serhan, M., C. Cailliez-Grimal, F. Borges, A. M. Revol-Junelles, C. Hosri y J. Fanni. 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26: 645–652.
- Serrano, P. H. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 469.
- Settanni, L. y A. Corsetti. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123–138.
- Settanni, L., O. Massitti, D. Van Sinderen y A. Corsetti. 2005. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 99: 670–681.
- Shaikh, F., P. Abhinand y P. Ragunath. 2012. Identification and characterization of *Lactobacillus salavarius* bacteriocins and its relevance in cancer therapeutics. *Bioinformation* 8: 589–594.
- Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas y M. Gilmore. 2004. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 609–618.
- Sharpe, M. E., L. R. Hill y S. P. Lapag. 1973. Pathogenic lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 6: 281–286.
- Shawyer, M. y A. F. Medina Pizzali. 2005. The use of ice on small fishing vessels. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 436.
- Shewan, J. M. 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. En: “*Recent advances in food science*”, pp. 167–193. Hawthorn, J. y J. Muil Leitch (eds.). Butterworths, Londres, Reino Unido.
- Shewan, J. M. 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. En: “*Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*”, pp. 51–66. Tropical Products Institute, Londres, Reino Unido.
- Shortt, C. 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 411–417.
- Sianidis, G., S. Karamanou, E. Vrontou, K. Boulias, K. Repanas, N. Kyrpides, A. S. Politou y A. Economou. 2001. Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J.* 20: 961–970.
- Sica, M. G., N. L. Olivera, L. I. Brugnioni, P. L. Marucci, A. C. López-Cazorla y M. A. Cubitto. 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45: 389–397.
- Siezen, R. J., O. P. Kuipers y W. M. de Vos. 1996. Comparison of the lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 171–184.
- Silk, D. B., A. Davis, J. Vulevic, G. Tzortzis y G. R. Gibson. 2009. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29: 508–518.
- Silkin, L., S. Hamza, S. Kaufman, S. L. Cobb y J. C. Vederas. 2008. Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 3103–3106.
- Silva, F. C. P., M. F. G. Brito, L. M. Farias y J. R. Nicoli. 2005. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J. Fish Biol.* 67: 1686–1698.
- Silva-Lopes, M. F., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo-Marques, R. Tenreiro y M. T. Barreto-Crespo. 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 191–198.

- Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J. M. Berjeaud.** 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6416–6420.
- Simonetta, A. C., L. G. Moraques de Velasco y L. N. Frisón.** 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 139–143.
- Simova, E. D., D. B. Beshkova y Zh. P. Dimitrov.** 2009. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 106: 692–701.
- Siragusa, G. R., C. N. Cutter y J. L. Willett.** 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16: 229–235.
- Sit, C. S. y J. C. Vederas.** 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.* 86: 116–123.
- Skaugen, M., C. I. Abildgaard y I. F. Nes.** 1997. Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Mol. Gen. Genet.* 253: 674–686.
- Skaugen, M., L. M. Cintas e I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Smit, G., B. A. Smit y W. J. M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 591–610.
- Smith, L. y J. D. Hillman.** 2008. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 401–408.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodríguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernández, B. Sanz y P. E. Hernández.** 1992. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 215–225.
- Song, J., S. J. Yang y J. C. Cho.** 2007. "Bring to lab" of 19 novel species among 60 isolates retrieved from a freshwater pond. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 168–175.
- Soutar, A. y J. D. Isaacs.** 1974. Abundance of pelagic fish during the 19th and 20th centuries as recorded in anaerobic sediment off the Californias. *Fish. Bull.* 72: 257–273.
- Spanggaard, B., F. Joergensen, L. Gram y H. H. Huss.** 1993. Antibiotic resistance against oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115: 195–207.
- Spanggaard, B., I. Huber, J. Nielsen, T. Nielsen, K. F. Appel y L. Gram.** 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182: 1–15.
- Sparo, M. D., M. S. Castro, P. J. Andino, M. V. Lavigne, C. Ceriani, G. L. Gutiérrez, M. M. Fernández, M. C. de Marzi, E. L. Malchiodi y M. A. Manghi.** 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 123–134.
- Sperstad, S. V., T. Haug, H. M. Blencke, O. B. Styrvold, C. Li y K. Stensvåg.** 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol. Adv.* 29: 519–530.
- Sprules, T., K. E. Kawulka y J. C. Vederas.** 2004. NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry* 43: 11740–11749.
- Stein, T., S. Heinzmann, S. Düsterhus, S. Borchert y K.-D. Entian.** 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.* 187: 822–828.
- Steinkraus, K. H.** 2002. Fermentations in world food processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 23–32.
- Stephens, S. K., B. Floriano, D. P. Cathcart, S. A. Bayley, V. F. Witt, R. Jimenez-Diaz, P. J. Warner y J. L. Ruiz-Barba.** 1998. Molecular analysis of the genes encoding Plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1871–1877.

- Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes y T. R. Klaenhammer.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613–3615.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Stiles, M. E. y J. W. Hastings.** 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* 2: 247–251.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1–29.
- Stolaki, M., W. M. de Vos, M. Kleerebezem y E. G. Zoetendal.** 2012. Lactic acid bacteria in the gut. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 385–401, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Storey, R. M.** 1982. Smoking. En: “*Fish handling and processing*”, pp. 98–114, 2ª edición. Aitken A. A., I. M. Mackie, J. H. Merritt y M. L. Windsor (eds.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido.
- Straume, D., M. Kjos, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2007. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol. Genet. Genomics* 278: 283–293.
- Stringer, S. C., C. E. R. Dodd, M. R. A. Morgan y W. M. Waites.** 1995. Locating nisin-producing *Lactococcus lactis* in a fermented meat system. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 341–348.
- Stroman, P., C. C. Müller y K. I. Sorensen.** 2003. Heat shock treatment increases the frequency of loss of an erythromycin resistance-encoding transposable element from the chromosome of *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7173–7180.
- Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y J. I. Azcona-Olivera.** 1996a. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2117–2121.
- Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. Morales, P. E. Hernández y J. I. Azcona-Olivera.** 1996b. Development of monoclonal antibodies to the lantibiotic nisin A. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2936–2940.
- Suárez, A. M., J. I. Azcona, J. M. Rodríguez, B. Sanz y P. E. Hernández.** 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4990–4992.
- Sudirman, I., F. Mathieu, M. Michel y G. Lefebvre.** 1993. Detection and properties of curvacin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Curr. Microbiol.* 27: 35–40.
- Sullivan, A. y C. E. Nord.** 2006. Probiotic lactobacilli and bacteraemia in Stockholm. *Scand. J. Infect. Dis.* 38: 327–331.
- Surendran, P. K., J. Joseph, A. V. Shenoy, P. A. Perigreen, K. M. Lyer y K. Gopakumar.** 1989. Studies on spoilage of commercially important tropical fishes under iced storage. *Fish. Res.* 1: 1–9.
- Suzzi, G. y F. Gardini.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 41–54.
- Švec, P., A. Ševčíková, I. Sedláček, J. Bednářová, C. Snauwaert, K. Lefebvre, P. Vandamme y M. Vancanneyt.** 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 192–196.
- Svetoch, E. A., B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. N. Borzenkov, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, Y. N. Kovalev, Y. G. Stepanshin, G. R. Siragusa, B. S. Seal y N. J. Stern.** 2008a. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1942–1948.
- Svetoch, E. A., V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko, B. V. Eruslanov, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. V. Perelygin, Y. G. Stepanshin y N. J. Stern.** 2008b. Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3863–3865.
- Svetoch, E. A., B. V. Eruslanov, V. P. Levchuk, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, J. Stepanshin, I. Dyatlov, B. S. Seal y N. J. Stern.** 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-

- 50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2749–2754.
- Swe, P. M., N. C. K. Heng, Y.-T. Ting, H. J. Baird, A. Carne, A. Tauch, J. R. Tagg y R. W. Jack.** 2007. *ef1097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 153: 3218–3227.
- Szajewska, H.** 2012. Human studies on probiotics: infants and children. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 525–542, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Sørensen, K. I., R. Larsen, A. Kibenich, M. P. Junge y E. Johansen.** 2000. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1253–1258.
- Tagg, J. R.** 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.* 119: 13–16.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani y L.W. Wanamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722–756.
- Tahara, T., K. Kanatani, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto y M. Oshimura.** 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1212–1215.
- Tahara, T., M. Oshimura, C. Umezawa y K. Kanatani.** 1996. Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 892–897.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Bénéch, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet e I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.
- Tahiri, I., M. Desbiens, E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss.** 2009. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiol.* 26: 783–793.
- Takala, T. M. y P. E. Saris.** 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 467–471.
- Talon, R., S. Leroy, I. Lebert, P. Giammarinaro, J. P. Chacornac, M. Latorre-Moratalla, C. Vidal-Carou, E. Zanardi, M. Conter y A. Lebecque.** 2008. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 227–234.
- Tamine, A. Y.** 2002. Microbiology of starter cultures. En: “*Dairy Microbiology Handbook*”, 3ª edición. Robinson, R. K. (ed.). Wiley Interscience, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Tanasupawat, S., S. Okada y K. Komagata.** 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 193–200.
- Tannock, G. W.** 2004. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3189–3194.
- Tarahomjoo, S.** 2012. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Mol Biotechnol.* 51: 183–199.
- Taylor, S. L., E. B. Somers y L. A. Krueger.** 1985. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J. Food Prot.* 48: 234–239.
- Temmerman, R., B. Pot, G. Huys y J. Swings.** 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1–10.
- Templer, S. P., P. Rohner y A. Baumgartner.** 2008. Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from foods and clinical specimens. *J. Food Prot.* 71: 2100–2104.

- Ten Brink, B., M. Minekus, J. M. van der Vossen, R. J. Leer y J. H. Huis in't Veld.** 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 140–148.
- Tenorio, C., M. Zarazaga, C. Martínez y C. Torres.** 2001. Bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2"-O-aminoglycoside phosphotransferase in *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 39: 824–825.
- Tham, W., H. Ericsson, S. Loncarevic, H. Unnerstad y M. L. Danielsson-Tham.** 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food. Microbiol.* 62: 173–175.
- Thapa, N., J. Pal y J. P. Tamang.** 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 33–38.
- Thompson, J. K., M. A. Collins y W. D. Mercer.** 1996. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 338–348.
- Thualt, D., E. Beliard, J. Le Guero y C. M. Bourgeois.** 1991. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74: 1145–1150.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1993. Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch. Microbiol.* 160: 279–283.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1994. Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology* 140: 361–367.
- Tiwari, B. K., V. P. Valdramidis, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke y P. J. Cullen.** 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5987–6000.
- Todorov, S. D.** 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. *Braz. J. Microbiol.* 40: 209–221.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2004. Screening of lactic acid bacteria from South African barely beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiol.* 49: 406–410.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2005a. Characterisation of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 45: 312–322.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2005b. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 318–326.
- Todorov, S., B. Onno, O. Sorokine, J. M. Chobert, I. Ivanova y X. Dousset.** 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 167–177.
- Todorov, S. D., C. A. van Reenen y L. M. Dicks.** 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 149–157.
- Todorov, S. D., M. B. Wachsman, H. Knoetze, M. Meincken y L. M. T. Dicks.** 2005. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25: 508–513.
- Todorov, S. D., M. Wachsman, E. Tomé, X. Dousset, M. T. Destro, L. M. Dicks, B. D. Franco, M. Vaz-Velho y D. Drider.** 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol.* 27: 869–879.

- Todorov, S. D., C. Rachman, A. Fourrier, L. M. Dicks, C. A. van Reenen, H. Prévost y X. Dousset. 2011a. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* 17: 23–31.
- Todorov, S. D., D. N. Furtado, S. M. Saad, E. Tomé y B. D. Franco. 2011b. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 110: 971–986.
- Tomé, E., P. A. Gibbs y P. C. Teixeira. 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 285–294.
- Tomé, E., S. D. Todorov, P. A. Gibbs y P. C. Teixeira, P. 2009. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* 23: 50–73.
- Toranzo, A. E., B. Novoa, J. L. Romalde, S. Núñez, S. Devesa, E. Marino, R. Silva, E. Martínez, A. Figueras y J. L. Barja. 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from 3 farms in Northwest Spain. *Aquaculture* 114: 189–202.
- Toranzo, A., B. Magariños, J. L. Romalde y J. L. Barja. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Méditerranéennes* 86: 155–176.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati y G. Giraffa. 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.* 11: 243–252.
- Trautner, B. W., R. A. Hull y R. O. Darouiche. 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 413–415.
- Truelstrup Hansen, L., T. Gill y H. H. Huss. 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold smoked salmon. *Food Res. Int.* 28: 101–103.
- Tsapieva, A., N. Duplik y A. Suvorov. 2011. Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef. Microbes.* 2: 255–261.
- Twomey, D. P., A. I. Wheelock, J. Flynn, W. J. Meaney, C. Hill y R. P. Ross. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin 3147. *J. Dairy Sci.* 83: 1981–1988.
- Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney y C. Hill. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 165–185.
- Työppönen, S., E. Petäjä y T. Mattila-Sandholm. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 233–244.
- Uguen, P., J. Hamelin, J. P. Le Pennec y C. Blanco. 1999. Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 291–293.
- Uhart, M., S. Ravishankar y N. D. Maks. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 degrees C. *J. Food Prot.* 67: 2296–2301.
- Urso, R., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi y L. Cocolin. 2005. Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 480–485.
- Urso, R., G. Comi y L. Cocolin. 2006a. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 671–680.
- Urso, R., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi y L. Cocolin. 2006b. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 232–239.
- Urso, R., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi y L. Cocolin. 2006c. Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 480–485.
- Uteng, M., H. H. Hauge, P. R. L. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer y C. Muhle-Goll. 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a

sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417–11426.

Vadyvaloo, V., J. W. Hastings, M. J. van der Merwe y M. Rautenbach. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5223–5230.

Vadyvaloo, V., J. L. Snoep, J. W. Hastings y M. Rautenbach. 2004a. Physiological implication of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150: 335–340.

Vadyvaloo, V., S. Arous, A. Gravesen, Y. Hechard, R. Chauchan-Haubrock, J. W. Hastings y M. Rautenbach. 2004b. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150: 3025–3033.

Valdivia, E., I. Martín-Sánchez, R. Quirantes, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y M. Maqueda. 1996. Incidence of antibiotic resistance and sex pheromone response among enterococci isolated from clinical human samples and from municipal waste water. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 538–544.

Valenzuela, A. S., N. Benomar, H. Abriouel, M. M. Cañamero y A. Gálvez. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* 27: 955–961.

van Asseldonk, M., W. M. de Vos y G. Simons. 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* Usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α -amylase. *Mol. Gen. Genet.* 240: 428–434.

van Asseldonk, M., G. Rutten, M. Oteman, R. J. Siezen, W. M. de Vos y G. Simons. 1990. Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95:155–160.

van Belkum, M. J. y M. E. Stiles. 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3573–3579.

van Belkum, M. J. y M. E. Stiles. 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17: 323–325.

van Belkum, M. J., B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok y G. Venema. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1187–1191.

van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings y T. Abee. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* 173: 7934–7941.

van Belkum, M. J., J. Kok y G. Venema. 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 572–579.

van de Guchte, M., J. Kok y G. Venema. 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 8: 73–92.

van den Berghe, E., T. de Winter y L. de Vuyst. 2006. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutriente depletion. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 159–170.

van Reenen, C. A., L. M. T. Dicks y M. L. Chikindas. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1131–1137.

van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl y L. M. T. Dicks. 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29–40.

van Roosmalen, M. L., N. Geukens, J. D. Jongbloed, H. Tjalsma, J. Y. Dubois, S. Bron, J. M. van Dijk y J. Anné. 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694: 279–297.

- van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl y A. J. M. Driessen. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 437–454.
- Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Bjorkroth, C. M. Franz, M. R. Foulquié Moreno, H. Revets, L. de Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio y W. H. Holzapfel. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1381–1391.
- Vancanneyt, M., G. Huys, K. Lefebvre, V. Vankerckhoven, H. Goossens y J. Swings. 2006. Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5376–5383.
- Vankerckhoven, V., P. Moreillon, S. Piu, M. Giddey, G. Huys, M. Vancanneyt, H. Goossens y J. M. Enteza. 2007. Infectivity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolates in a rat model of experimental endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 56: 1017–1024.
- Vankerckhoven, V., G. Huys, M. Vancanneyt, C. Snauwaert, J. Swings, I. Klare, W. Witte, T. Van Autgaerden, S. Chapelle, C. Lammens y H. Goossens. 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4247–4255.
- Varella-Coelho, M. L., J. dos Santos-Nascimento, P. C. Fagundes, D. J. Madureira, S. S. Oliveira, M. A. Vasconcelos y M. C. F. Bastos. 2007. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res. Microbiol.* 158: 625–630.
- Vaughan, A. V. G. H. Eijssink, T. F. O’Sullivan, K. O’Hanlon y D. van Sinderen. 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., V. G. Eijssink y D. Van Sinderen. 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194–7203.
- Vaughan, A., S. Rouse y D. van Sinderen. 2004a. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.* 110: 181–188.
- Vaughan, A., J. O’Mahony, V. G. Eijssink, M. O’Connell-Motherway y D. van Sinderen. 2004b. Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 377–384.
- Vaughan, E. E., C. Daly y G. F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 299–308.
- Vaughan, E. E., H. G. Heilig, K. Ben-Amor y W. M. de Vos. 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 477–490.
- Vázquez-Rowe, I., M. T. Moreira y G. Feijoo. 2011a. Life cycle assessment of fresh hake fillets captured by the Galician fleet in the Northern Stock. *Fish. Res.* 110: 128–135.
- Vázquez-Rowe, I., M. T. Moreira y G. Feijoo. 2011b. Estimating global discards and their potential reduction for the Galician fishing fleet (NW Spain). *Mar. Policy.* 35: 140–147.
- Vaz-Velho, M., S. Todorov, J. Ribeiro y P. Gibbs. 2005. Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergenes* V41 culture and supernatant. *Food Control* 16: 541–549.
- Vela, A. I., A. Fernández, A. Espinosa de los Monteros, J. Goyache, P. Herraez, B. Tames, F. Cruz, L. Domínguez y J. F. Fernández-Garayzábal. 2008. *Lactobacillus ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Ziphius cavirostris*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 891–894.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. de Leij, G. Venema y J. Kok. 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.* 14: 521–532.
- Venema, K., J. Kok, J. D. Marugg, M. Y. Toonen, A. M. Ledeboer, G. Venema y L. M. Chikindas. 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17: 515–522.

- Venema, K., M. L. Chikindas, J. F. M. I. Seegers, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, G. Venema y J. Kok.** 1997. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 305–309.
- Venugopal, H., P. J. Edwards, M. Schwalbe, J. K. Claridge, D. S. Libich, J. Stepper, T. Loo, M. L. Patchett, G. E. Norris y S. M. Pascal.** 2011. Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry* 50: 2748–2755.
- Vera Pingitore, E., E. M. Hébert, M. E. Nader-Macías y F. Sesma.** 2009. Characterization of salivaricin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 isolated from the human vagina. *Res. Microbiol.* 160: 401–408.
- Vera Pingitore, E., E. Bru y M. I. Elena Nader-Macías.** 2012. Effect of lyophilization and storage temperature on the activity of salivaricin CRL 1328, a potential bioactive ingredient of a urogenital probiotic product. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 71–81.
- Vermeiren, L., F. Devlieghere y J. Debevere.** 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 149–164.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete.** 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 655–671.
- Vescovo, M., C. Orsi, G. Scolari y S. Torriani.** 1995. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 121–125.
- Vesterlund, S., V. Vankerckhoven, M. Saxelin, H. Goossens, S. Salminen y A. C. Ouwehand.** 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 325–331.
- Vignolo, G., S. Fadda, M. N. de Kairuz, A. A. de Ruiz Holgado y G. Oliver.** 1996. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by ‘Lactocin 705’, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 397–402.
- Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farías, F. Sesma, U. Schillinger, W. Holzapfel y G. Oliver.** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41: 410–416.
- Vignolo, G. M., C. Fontanta y P. S. Cocconcelli.** 2010. New approaches for the study of lactic acid bacteria biodiversity: a focus on meat ecosystems. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 251–271, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Vijayabaskar, P. y S. T. Somasundaram.** 2008. Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology* 7: 124–128.
- Vilcinskas, A., K. Mukherjee y H. Vogel.** 2013. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc. R. Soc. B.* 280: 20122113. doi: 10.1098/rspb.2012.2113
- Vine, N. G., W. D. Leukes y H. Kaiser.** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 404–27.
- Vogel, R. F., M. Lohmann, M. Nguyen, A. N. Weller y W. P. Hammes.** 1993a. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lact. sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 295–300.
- Vogel, R. F., B. S. Pohle, P. S. Tichaczek y W. P. Hammes.** 1993b. The competitive advantage of *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in sausage fermentations is caused by formation of curvacin A. *System. Appl. Microbiol.* 16: 457–462.
- von Wright, A. y L. Axelsson.** 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 1–16, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

- Wachsman, M. B., V. Castilla, A. P. de Ruiz Holgado, R. A. de Torres, F. Sesma y C. E. Coto. 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* 58: 17–24.
- Wahlström, G. y P. E. J. Saris. 1999. A nisin bioassay based on bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3742–3745.
- Wallace, T. D., S. Bradley, N. D. Buckley y J. M. Green-Johnson. 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J. Food Prot.* 66: 466–472.
- Wallet, F., R. Dessein, S. Armand y R. J. Courcol. 2002. Molecular diagnosis of endocarditis due to *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. *Clin. Infect. Dis.* 35: 117–119.
- Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey y M. J. Coventry. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Microbiol.* 82: 273–280.
- Wandersman, C. 1998. Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res. Microbiol.* 149: 163–170.
- Wang, C.-Y. C., H.-S. Shie, S.-C. Chen, J.-P. Huang, I.-C. Hsieh, M.-S. Wen, F.-C. Lin y D. Wu. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.* 61: 68–73.
- Wang, Y., J. Wang, Z. Ahmed, X. Bai y J. Wang. 2011. Complete genome sequence of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. *J. Bacteriol.* 193: 4280–4281.
- Ward, D. R. y N. J. Baj. 1988. Factors affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technol.* 42: 85–89.
- Watabe, S., H. Ushio, M. Iwamoto, M. Kamal, H. Ioka y K. Hashimoto. 1989. Rigor-mortis progress of sardine and mackerel in association with ATP degradation in lactate accumulation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1833–1939.
- Watabe, S., M. Kamal y K. Hashimoto. 1991. Postmortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. *J. Food Sci.* 56: 151–153.
- Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. van Sinderen y J. Kok. 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189: 3256–3270.
- Wells, J. 2011. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2: 423–445.
- Wells, J. M. y A. Mercenier. 2003. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 261–315. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Wessels, S., L. Axelsson, E. B. Hansen, L. de Vuyst, S. Laulund, L. Lähteenmäki, S. Lindgren, B. Mollet, S. Salminen y A. von Wright. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 498–505.
- West, C. A. y P. J. Warner. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 163–165.
- WHO (World Health Organization). 1988. Foodborne listeriosis. Report of the WHO Working Group. *Bulletin of the World Health Organization* 66: 421–428.
- Wilson, B., B. S. Danilowicz y W. G. Meijer. 2008. The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microb. Ecol.* 55: 425–434.
- Wilson, I. G. y G. G. McAfee. 2002. Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 143–151.
- Witte, W., R. Wirth y I. Klare. 1999. Enterococci. *Chemotherapy* 45: 135–145.
- Woese, C. R., O. Kandler y M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576–4579.

- Wolf, B. W., K. B. Wheeler, D. G. Ataya y K. A. Garleb.** 1998. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food Chem. Toxicol.* 36: 1085–1094.
- Woo, P. C., S. K. Lau, A. W. Lin, S. O. Curreem, A. M. Fung y K.-Y. Yuen.** 2007. Surgical site abscess caused by *Lactobacillus fermentum* identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 251–254.
- Worobo, R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140: 517–526.
- Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177: 3143–3149.
- Wouters, J. T. M., E. H. E. Ayad, J. Hugenholtz y G. Smit.** 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91–109.
- Xiraphi, N., M. Georgalaki, G. V. Driessche, B. Devreese, J. V. Beeumen, E. Tsakalidou, J. Metaxopoulos y E. H. Drosinos.** 2006. Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 19–26.
- Xu, X., D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F. Wang, G. A. Jacoby y M. Wang.** 2010. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4643–4647.
- Xue, J., I. Hunter, T. Steinmetz, A. Peters, B. Ray y K. W. Miller.** 2005. Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1283–1290.
- Xunta de Galicia.** 2008. Anuario de Pesca. Consellería do Medio Rural e do Mar, Galicia, España.
- Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue y T. J. Montville.** 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66: 1420–1425.
- Yanagida, F., Y. S. Chen y M. Yasaki.** 2007. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *J. Basic Microbiol.* 47: 184–190.
- Yang, E., L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette y S. Fillmore.** 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express.* 2: 48.
- Yang, R. y B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281–291.
- Yang, R., M. C. Johnson y B. Ray.** 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355–3359.
- Yoon, Y. C., H. J. Park, N.-K. Lee y H.-D. Paik.** 2005. Characterization and enhanced production of enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 isolated from human skin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 296–303.
- Young, J. e I. B. Holland.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 177–200.
- Yuan, J., J. C. Zweers, J. M. van Dijk y R. E. Dalbey.** 2010. Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 179–199.
- Zamfir, M. y S. Grosu-Tudor.** 2009. Impact of stress conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 and production of acidophilin 801. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55: 277–282.
- Zasloff, M.** 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449–5453.
- Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395.

- Zein, E. F., S. Karaa, A. Chemaly, I. Saidi, W. Daou-Chahine y R. Rohban.** 2008. *Lactobacillus rhamnosus* septicaemia in a diabetic patient associated with probiotic use: a case report. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 66: 195–198.
- Zendo, T., J. Nakayama, K. Fujita y K. Sonomoto.** 2007. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *J. Appl. Microbiol.* 104: 499–507.
- Zeng, Z., J. Lin y D. Gong.** 2009. Identification of lactic acid bacteria strains with high conjugated linoleic acid-producing ability from natural sauerkraut fermentations. *J. Food Sci.* 74: 154–158.
- Ze-Ze, L., R. Tenreiro, A. Duarte, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, L. Lito, M. M. Carmo, S. Felisberto y G. Carmo.** 2004. Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *J. Med. Microbiol.* 53: 451–453.
- Zhang, J., Y. Zhang, S. N. Liu, Y. Han y Z. J. Zhou.** 2012. Modelling growth and bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a function of temperature and pH value. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 1388–1400.
- Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. E. Mueller y A. H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 36: 641–647.
- Zhou, A., Y. Liu, P. Shi, S. He, B. Yao y E. Ringø.** 2009. Molecular characterization of the autochthonous microbiota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages. *Aquaculture* 286: 184–189.
- Zhou, J. S., C. J. Pillidge, P. K. Gopal y H. S. Gill.** 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 211–217.
- Zhou, X. X., W. F. Li, G. X. Ma e Y. J. Pan.** 2006. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol. Adv.* 24: 285–295.
- Zorič Peternel, M., A. Čanžek Majhenič, H. Holo, I. F. Nes, Z. Salehian, A. Berlec e I. Rogelj.** 2010. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics Antimicro. Prot.* 2: 233–140.
- Zottola, E. A., T. L. Yezzi, D. B. Ajao y R. F. Roberts.** 1994. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 227–238.
- Zouhir A., R. Hammami, I. Fliss y J. B. Hamida.** 2010. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein J.* 29: 432–439.

CAPÍTULO XI

RESUMEN AMPLIADO

XI.1. INTRODUCCIÓN

La actividad pesquera produce uno de los productos alimenticios más perecederos y sujeto generalmente a un extenso comercio internacional, por lo que resulta necesaria una industria, unos medios de conservación y transporte y unas redes de comercialización capaces de mantener una adecuada calidad higiénico-sanitaria y seguridad durante todas las etapas por las que atraviesan estos productos hasta llegar al consumidor final. Ésto es especialmente importante en las zonas pesqueras en las que la flota faena a una gran distancia de su puerto base, como es el caso de la flota pesquera española y, concretamente, la flota gallega. Los largos periodos de tiempo necesarios para el transporte del pescado desde los barcos pesqueros hasta el consumidor proporcionan abundantes oportunidades para el crecimiento microbiano y las contaminaciones cruzadas, haciendo que resulte difícil el mantenimiento de la calidad higiénico-sanitaria y seguridad requeridas para estos productos (Gram y Huss, 1996). Además, los productos que llegan al mercado en buenas condiciones de conservación alcanzan generalmente precios más altos, tanto en el comercio mayorista como en el minorista, y, en consecuencia, generan un mayor rendimiento económico de la actividad pesquera; en estas circunstancias, resulta evidente la necesidad de mejorar la manipulación, el cuidado y la conservación de las capturas. A este respecto, inmediatamente después de la captura de los peces, comienzan a producirse una serie de cambios químicos y biológicos llevados a cabo por las enzimas propias del pescado (cambios autolíticos) y por microorganismos (cambios microbiológicos), que en última instancia pueden conducir a un rechazo del pescado para el consumo humano debido a su descomposición y deterioro (Huss, 1995). La mayor parte de las operaciones de procesamiento posteriores a la captura tienen como objetivo ralentizar estos procesos para que el pescado llegue al consumidor en condiciones óptimas. En este contexto, la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas de conservación tras la captura para controlar la carga microbiana del pescado es esencial para: (i) incrementar su vida útil; (ii) reducir las pérdidas físicas, organolépticas y nutricionales, y (iii) preservar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad del producto final. A este respecto, la bioconservación, que se define como la extensión de la vida útil y mejora de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002), resulta una tecnología muy interesante, de fácil aplicación y rentable económicamente que, combinada con otras tecnologías, como, por ejemplo, la refrigeración, puede constituir una estrategia eficaz para la conservación del pescado fresco recién capturado (Leistner, 2000; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, se han realizado un gran número de estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas (*i.e.*, bacteriocinogénicas) y/o sus bacteriocinas como bioconservantes de diversos alimentos como, entre otros, la leche, el queso y otros productos lácteos, los productos cárnicos, los vegetales y, en menor medida, el pescado y los productos de la pesca (Hugas, 1998; Brillet *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Settanni y Corsetti, 2008; El Bassi *et al.*, 2009). A este respecto, y de forma general, existen cuatro estrategias para el empleo de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y sus bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la(s) bacteriocina(s) *in*

situ, como cultivo protector y/o cultivo iniciador; (ii) adición de un medio fermentado por una bacteria láctica bacteriocinogénica o por una cepa recombinante bacteriocinogénica como ingrediente alimentario; (iii) adición de las bacteriocinas y/o sus mezclas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad como aditivo alimentario, e (iv) incorporación o inmovilización de las bacteriocinas en el material de envasado de los alimentos con el fin de desarrollar un envase activo (Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). En este contexto, conviene destacar que el desarrollo de estrategias de bioconservación para el pescado y los productos de la pesca requiere la identificación de bacterias lácticas adecuadas para este fin, preferentemente aisladas de la microbiota autóctona del pescado, sus derivados y/o su ambiente acuícola, ya que, presumiblemente, estarán mejor adaptadas a este tipo de hábitats y, por lo tanto, serán más competitivas en estos sustratos que las bacterias lácticas de otros orígenes (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009).

Las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se aíslan frecuentemente de los alimentos, en los que favorecen el desarrollo de sus características organolépticas y reológicas típicas y/o aumentan sus cualidades nutritivas (Cintas y Casaus, 1998). Además, contribuyen favorablemente a su conservación y seguridad debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y patógenos como, entre otros, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* (Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2010). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato alimentario en el que se desarrollan y la formación de ácidos orgánicos (principalmente ácidos láctico y acético), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, también producen otros metabolitos antimicrobianos entre los que se incluyen el etanol, el dióxido de carbono, el diacetilo, el acetaldehído, el peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, el benzoato, los isómeros D de los aminoácidos, la reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, un grupo heterogéneo de sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2012). Históricamente, las bacterias lácticas se han asociado a la fermentación espontánea e industrial de los alimentos, por lo que en la actualidad se consideran microorganismos seguros para el consumo humano; esto es, gozan del estatus GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) o su equivalente europeo QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*) (EFSA, 2004; EFSA, 2005a, 2005b, 2005c; EFSA, 2008a; EFSA, 2011). Por ello, desde hace tiempo, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos antimicrobianos están recibiendo una gran atención por su posible aplicación como bioconservantes en la industria alimentaria, como una barrera adicional en las estrategias combinadas de conservación de los alimentos (tecnología de obstáculos). A este respecto, esta estrategia permitiría incrementar la vida útil y seguridad de los alimentos, así como reducir el empleo de aditivos químicos y la intensidad de los tratamientos tecnológicos que pudieran interferir negativamente en su calidad organoléptica y/o nutricional (Leistner, 2000; Cleveland *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2002; Brillet *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2010).

XI.2. OBJETIVOS

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos globales: (i) aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca) con actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos del pescado y los productos de la pesca; (ii) evaluación del potencial biotecnológico y la seguridad *in vitro* de la(s) cepa(s) con un mayor espectro de acción antimicrobiana, lo que incluye la caracterización bioquímica y genética de su(s) bacteriocina(s); (iii) desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado a escala de laboratorio y semiindustrial utilizando la(s) bacteria(s) láctica(s) bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s), y, por último, (iv) producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) y detección y cuantificación de su producción por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) salvaje(s) y la(s) bacterias(s) recombinante(s) generadas en este trabajo empleando para ello diversas técnicas microbiológicas e inmunoquímicas. Para lograr estos objetivos globales resulta necesario proceder al desarrollo y consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento y cuantificación de la microbiota total, láctica y enterococal de diversos sustratos alimentarios de origen marino (pescado, marisco y productos de la pesca).
2. Identificación y preselección de bacterias lácticas de origen marino con actividad antimicrobiana directa y extracelular frente a diversos microorganismos indicadores, entre los que se incluyen *L. monocytogenes* y diversos alterantes y patógenos del pescado y productos de la pesca como *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*, además de diversas bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario caracterizadas previamente.
3. Filiación taxonómica de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa de origen marino seleccionadas.
4. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino frente a otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en las industrias alimentaria, farmacéutica y veterinaria, entre los que se incluyen *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*.
5. Evaluación mediante el empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la presencia en las cepas de *Enterococcus* spp. bacteriocinogénicas de origen marino de genes estructurales que codifican enterocinas descritas previamente.
6. Evaluación de la seguridad *in vitro* de las cepas de *Enterococcus* spp. bacteriocinogénicas de origen marino.
 - 6.1. Evaluación de la susceptibilidad a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria.
 - 6.2. Evaluación mediante PCR de la presencia de los determinantes genéticos que codifican la síntesis de diversos factores de virulencia descritos en el género *Enterococcus*.

7. Evaluación del potencial biotecnológico y la seguridad *in vitro* de la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.1. Evaluación mediante PCR de la presencia de los genes estructurales que codifican bacteriocinas previamente descritas en la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.2. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) del(os) sobrenadante(s) del(os) cultivo(s) de la(s) bacteria(s) láctica(s) de origen marino seleccionada(s) y determinación de su tamaño molecular.
 - 7.3. Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) bacteriocina(s) purificada(s) producidas por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.4. Caracterización genética de la(s) bacteriocina(s) producida(s) por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.5. Determinación de la actividad antimicrobiana específica de la(s) bacteriocina(s) purificada(s) producidas por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
 - 7.6. Evaluación de la seguridad *in vitro* de la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
8. Desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco a escala de laboratorio y semiindustrial utilizando la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) de origen marino seleccionada(s).
9. Obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) para su detección y cuantificación mediante el empleo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).
10. Producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) por *Lactococcus lactis*.
11. Evaluación mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas de la producción de la(s) bacteriocina(s) por la(s) bacteria(s) láctica(s) (multi)bacteriocinogénica(s) salvaje(s) y la(s) bacteria(s) recombinante(s) de *Lc. lactis* generadas en este trabajo.

XI.3. RESULTADOS

En el Capítulo III se describe el aislamiento, el espectro de acción antimicrobiana y la caracterización de bacterias lácticas bacteriocinogénicas aisladas de una amplia variedad de pescados, mariscos y productos de la pesca. Los resultados obtenidos revelaron una gran variación en la población de bacterias lácticas de las muestras, dependiendo del sustrato y la parte anatómica analizada. De la microbiota láctica se seleccionaron un total de 1.245 cepas y se evaluó su actividad antimicrobiana directa mediante la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP) (Cintas *et al.*, 1995) frente a 20 microorganismos indicadores Gram-positivos y Gram-negativos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria. De éstas, 197 bacterias lácticas mostraron actividad antimicrobiana directa en

medio sólido, revelando una gran heterogeneidad en su espectro antimicrobiano. Las 64 bacterias lácticas seleccionadas se analizaron mediante un ensayo de difusión en agar (TDA) (Cintas *et al.*, 1995) para determinar su actividad antimicrobiana extracelular, revelando los resultados obtenidos que solamente 25 cepas secretaron sustancias antimicrobianas termoestables de naturaleza proteica (*i.e.*, bacteriocinas) en sus sobrenadantes libres de células. La identificación taxonómica de las 64 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas se llevó a cabo mediante diversas pruebas bioquímicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación nucleotídica del gen que codifica el ARNr 16S (*ADNr 16S*) (Kullen *et al.*, 2000) y/o el gen de la superóxido dismutasa (*sodA*) (Poyart *et al.*, 2000), y/o el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), lo que permitió determinar que 46 cepas pertenecen al género *Enterococcus*, de las que 24 se identificaron como *Enterococcus faecium* y 22 como *Enterococcus faecalis*. En lo que respecta a las 18 cepas no enterococales, siete fueron identificadas como *Pediococcus pentosaceus*, cinco como *Weissella cibaria*, tres como *Lactobacillus sakei* subesp. *carneus*, una como *Lb. sakei* subesp. *sakei*, una como *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus* y una como *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris*. Conviene destacar que ninguna de las cepas de *E. faecalis* con actividad antimicrobiana directa mostró actividad antimicrobiana extracelular bajo las condiciones experimentales ensayadas. Las 20 cepas de enterococos bacteriocinogénicos se analizaron mediante PCR para la detección de los genes que codifican enterocinas descritas previamente, lo que reveló que el 90% amplificaron, al menos, uno de los genes estructurales evaluados, siendo los más abundantes los que codifican enterocina L50 (L50A y L50B) (EntL50 [EntL50A y EntL50B]) y enterocina P (EntP) (65 y 60%, respectivamente). A este respecto, se detectaron hasta cuatro genes estructurales de enterocinas en una misma cepa, en particular los que codifican EntP, EntL50 (EntL50A y EntL50B) y enterocina Q (EntQ). Además, se realizó una evaluación preliminar de la seguridad *in vitro* de las cepas de *E. faecium* mediante la detección de potenciales factores de virulencia, el análisis de la producción de hemolisina y gelatinasa y un ensayo de susceptibilidad a diversos antibióticos de relevancia en medicina humana y veterinaria. Los resultados obtenidos demostraron que el pescado, el marisco y los productos de la pesca constituyen nichos ecológicos adecuados para el aislamiento de bacterias lácticas, incluyendo cepas (multi) bacteriocinogénicas, principalmente enterococos que codifican enterocinas descritas previamente o, en menor medida, no descritas, con un amplio espectro de acción antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

De las 25 bacterias lácticas bacteriocinogénicas (20 *E. faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. y 1 *P. pentosaceus*), las cepas *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35 se seleccionaron para su posterior caracterización debido a su amplio espectro de acción y su potente actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. En el capítulo IV se evaluó mediante PCR, empleando cebadores específicos de los genes estructurales que codifican la curvacina A (CurA), sakacina P (SakP) y sakacina Q (SakQ) (*curA*, *sppA* y *sppQ*, respectivamente), la presencia de estos genes estructurales en las cepas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas, mostrando los resultados obtenidos que *Lb. curvatus* BCS35 fue la única cepa que amplificó *sppA* y *sppQ*. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas bacteriocinogénicas *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673

(productora de SakP) (Tichaczek *et al.*, 1992) y *Pediococcus acidilactici* 347 (productora de pediocina PA-1 [PedPA-1]) (Cintas *et al.*, 1998) frente a *Listeria* spp. y diversas bacterias lácticas se comparó mediante TDA (Cintas *et al.*, 1995) y un ensayo en placas microtituladoras (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000). La purificación de las bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 y *P. acidilactici* 347 se llevó a cabo empleando un protocolo multicromatográfico que incluyó precipitación con sulfato amónico y diversas cromatografías de filtración en gel, intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) (Casaus *et al.*, 1997), lo que permitió determinar que la actividad antimicrobiana de *Lb. curvatus* BCS35 es debida a la producción de, al menos, dos bacteriocinas. Los dos péptidos purificados, denominados curvacina G14 (CurG14) y curvacina G15 (CurG15), se sometieron a espectrometría de masas, lo que reveló que presentan una masa molecular de 4.460,9 y 4.362,3 Da, respectivamente. Mediante la determinación de su secuencia aminoacídica y/o nucleotídica se determinó que CurG14 y CurG15 son muy similares o idénticas a las bacteriocinas de la clase IIa SakP, previamente descrita en *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992) y sakacina X (SakX), previamente descrita en *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), respectivamente. De hecho, CurG14 sólo difiere de SakP en la posición 12 (Tyr en lugar de His), lo que está en concordancia con la diferencia detectada en sus masas moleculares (4.460,9 y 4.435,0, respectivamente). Las bacteriocinas CurG14 (variante de la SakP), CurG15 (SakX), SakP y PedPA-1 purificadas se enfrentaron a diversas cepas de *Listeria* spp. y bacterias lácticas con el objetivo de: (i) comparar su actividad antimicrobiana específica, y (ii) determinar si la sustitución Tyr12/His12 en CurG14/SakP produce algún efecto en la potencia y/o especificidad antimicrobiana de estas bacteriocinas. Finalmente, se determinó la seguridad *in vitro* de la cepa *Lb. curvatus* BCS35 mediante un ensayo de susceptibilidad a diversos antibióticos de relevancia en medicina humana y veterinaria y el análisis de su actividad hemolisina, gelatinasa y proteasa.

En el Capítulo V se describe el desarrollo de estrategias de bioconservación del pescado fresco recién capturado basadas en el empleo de bacterias lácticas multibacteriocinogénicas de origen marino. Para ello, las bacterias lácticas multibacteriocinogénicas *Lb. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58, aisladas previamente de bacalao salado (*Gadus morhua*) y bonito (*Thunnus alalunga*), respectivamente (Capítulo III), se seleccionaron debido a su capacidad para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* y otros microorganismos alterantes y patógenos de interés para la industria alimentaria como *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens* y *Shewanella putrefaciens*. Para la realización de estos ensayos se seleccionaron dos especies de pescado de gran valor comercial, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus boscii*), y los ejemplares se adquirieron en la lonja de Marín (Pontevedra, España) después de una noche en refrigeración en la bodega de un barco de bajura. El potencial de bioconservación y la estrategia de aplicación de estas dos bacterias lácticas multibacteriocinogénicas se ensayaron primero a escala de laboratorio, inoculándose diversos lotes de pescado fresco con: (i) el cultivo de la bacteria láctica como cultivo protector; y/o (ii) el sobrenadante libre de células como ingrediente alimentario, y/o (iii) sobrenadante liofilizado como ingrediente alimentario liofilizado. Todos los lotes se conservaron en cajas de poliestireno, que se rellenaron continuamente con hielo, y se mantuvieron en una cámara de refrigeración a 0–2°C durante 14 días.

Durante este experimento se realizaron tanto análisis microbiológicos, que incluyeron recuentos bacterianos de aerobios mesófilos (Anónimo, 2003a), coliformes (Anónimo, 1991), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Anónimo, 2003b), estafilococos coagulasa-positivos (Anónimo, 1999), *Clostridium* spp. y *Listeria* spp. (Anónimo, 1996), como análisis sensoriales que incluyen, entre otros, apariencia general, limo de la piel, color y olor de las agallas, morfología del ojo y adherencia del peritoneo. Con base en los resultados obtenidos se seleccionó *Lb. curvatus* BCS35 para realizar los ensayos de bioconservación a escala semiindustrial, en los que se evaluaron combinaciones de tres estrategias diferentes de aplicación. Para ello, esta cepa multibacteriocinogénica se desarrolló en un fermentador semiindustrial en caldo MRS modificado y se inocularon tres lotes de pescado fresco recién capturado con el cultivo protector y/o el ingrediente alimentario, almacenándose a continuación en hielo en una cámara de refrigeración a 0–2°C en la lonja de Marín durante 14 días. Los análisis microbiológicos citados anteriormente se llevaron a cabo durante el periodo de almacenamiento y los resultados mostraron que cuando el cultivo de *Lb. curvatus* BCS35 o el correspondiente sobrenadante libre de células se empleaban como cultivo protector o ingrediente alimentario, respectivamente, los recuentos bacterianos de estos lotes eran significativamente menores que los del lote control, tanto para la pescadilla como para el gallo; además, en ambos ensayos se inhibió la presencia de *Listeria* spp. en las muestras bioconservadas de gallo. Finalmente, un experto tasador oficial de pescado de la lonja de Marín valoró el efecto del cultivo protector y el ingrediente alimentario en las características sensoriales del pescado, concluyendo que los lotes bioconservados alcanzarían un precio más alto en el mercado que los respectivos lotes control, lo que demuestra que la cepa multibacteriocinogénica de origen marino *Lb. curvatus* BCS35 puede considerarse una candidata apropiada para su aplicación como bioconservante del pescado fresco recién capturado.

El amplio espectro antimicrobiano de las bacteriocinas CurG14 y CurG15 producidas por *Lb. curvatus* BCS35 (Capítulo III), que son responsables, en parte, de la actividad antimicrobiana ejercida por esta cepa multibacteriocinogénica (Capítulo IV), así como la demostración *in vivo* de la eficacia de estas bacteriocinas y la cepa productora para la bioconservación del pescado fresco recién capturado (Capítulo V), motivó el interés en el desarrollo de hospedadores heterólogos que permitieran incrementar la actividad antimicrobiana y/o producción de estas bacteriocinas. A este respecto, en el Capítulo VI se describe la producción heteróloga de CurG14 y CurG15 por *Lactococcus lactis*, así como la detección y cuantificación de su producción por la cepa multibacteriocinogénica salvaje y las cepas recombinantes bacteriocinogénicas mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas. Para ello, quimeras génicas que codifican el péptido señal de la proteína Usp45 (SP_{Usp45}) fusionado a las bacteriocinas CurG14 y CurG15 maduras se clonaron en el plásmido pNZ8048 (Kuipers *et al.*, 1998), bajo el control del promotor inducible de nisina A (P_{nisA}), generando los plásmidos pNUG14E y pNUG15E, respectivamente. Estos plásmidos se transformaron en *Lc. lactis* NZ9000, resultando en varias cepas recombinantes de las cuales *Lc. lactis* NZ9000-69 (pNUG14E) y *Lc. lactis* NZ9000-12 (pNUG15E) se seleccionaron para su caracterización. Los análisis de espectrometría de masas de CurG14 y CurG15 purificadas de los sobrenadantes de estas cepas recombinantes demostraron que ambos péptidos se procesan y secretan correctamente. La actividad antimicrobiana y la producción de estas bacteriocinas

por las cepas recombinantes se detectó y cuantificó en los sobrenadantes libres de células de los cultivos inducidos con nisina A (NisA), a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600}) de 0,3, 0,5 y 0,9, y desarrollados posteriormente durante 1,5, 3 y 5 h, comparándose los resultados obtenidos con los correspondientes a los de los sobrenadantes de los cultivos de *Lb. curvatus* BCS35 desarrollados a 4, 8, 18, 25, 30 y 37°C. La máxima actividad antimicrobiana de las cepas recombinantes seleccionadas *Lc. lactis* NZ9000-69 (pNUG14E) y *Lc. lactis* NZ9000-12 (pNZG15E) (2.430 y 22.843 UB/ml) se alcanzó a un DO_{600} de 0,5 y tras 3 h de crecimiento después de la inducción. De la misma forma, la cuantificación de las bacteriocinas mediante un ensayo enzimático no competitivo (ELISA-NCI) empleando los anticuerpos policlonales específicos para CurG14 y CurG15 obtenidos en este trabajo, reveló que las citadas condiciones de crecimiento también permitieron la máxima producción de ambas bacteriocinas (4.896 y 17.149 ng/ml de CurG14 y CurG15, respectivamente). Conviene destacar que estas concentraciones de CurG14 y CurG15 representaron un aumento de la producción de 20 y 4 veces, respectivamente, con respecto a la máxima producción cuantificada para la cepa salvaje *Lb. curvatus* BCS35, lo que demuestra la utilidad de la estrategia genética desarrollada y de las cepas recombinantes bacteriocinogénicas generadas en este trabajo para la producción heteróloga de estas bacteriocinas de amplio espectro de acción antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

XI.4. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación son las siguientes:

1. El pescado, el marisco y los productos de la pesca constituyen una fuente adecuada para el aislamiento de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana. De 1.245 bacterias lácticas de origen marino evaluadas en este trabajo, aisladas de 16 muestras de pescado, marisco y productos de la pesca, se identificaron 197 cepas con actividad antimicrobiana directa, lo que representa un 15,8%; de éstas, 158 cepas, lo que representa un 12,7% del total, inhibieron el desarrollo de, al menos, una de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas. De las 64 bacterias lácticas seleccionadas, 25 cepas, lo que representa un 39,1%, mostraron actividad antimicrobiana extracelular debida a la producción de bacteriocinas termoestables con espectros de acción heterogéneos.
2. Las 64 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana directa seleccionadas se clasificaron taxonómicamente como *Enterococcus faecium* (24 cepas; 37,5%), *Enterococcus faecalis* (22 cepas; 34,4%), *Pediococcus pentosaceus* (7 cepas; 10,9%), *Weissella cibaria* (5 cepas; 7,8%), *Lactobacillus sakei* (4 cepas; 6,3%), *Lactobacillus curvatus* (1 cepa; 1,6%) y *Leuconostoc mesenteroides* (1 cepa; 1,6%). Las 25 cepas bacteriocinogénicas se identificaron como *Enterococcus faecium* (20 cepas), *Lactobacillus sakei* (3 cepas), *Lactobacillus curvatus* (1 cepa) y *Pediococcus pentosaceus* (1 cepa).
3. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió determinar la presencia de los genes estructurales de enterocinas caracterizadas previamente en 18 de las 20 cepas bacteriocinogénicas de *Enterococcus faecium*, y los genes estructurales más extendidos, tanto solos

como en combinación, fueron los que codifican la enterocina L50 (L50A y L50B) y la enterocina P, detectándose en un 65 y 60% de las cepas de *Enterococcus faecium*, respectivamente.

4. La cepa *Lactobacillus curvatus* BCS35, aislada de bacalao salado (*Gadus morhua*), puede considerarse una cepa segura y posee un amplio y potente espectro de acción antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, especialmente *Listeria monocytogenes*, debido a la producción de, al menos, dos bacteriocinas de la clase IIa: (i) curvacina G14, una variante de la sakacina P que contiene un residuo de tirosina en vez de histidina en posición 12 de la bacteriocina madura, y (ii) curvacina G15, una bacteriocina idéntica a la sakacina X. Además, en el genoma de *Lactobacillus curvatus* BCS35 se identificaron también los genes estructurales que codifican la sakacina T (SakT_α y SakT_β) y la sakacina Q.
5. En este trabajo se describe por primera vez la eficacia del empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas como bioconservantes del pescado fresco, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus boschii*), durante su almacenamiento en refrigeración durante 14 días. Los análisis microbiológicos realizados en los lotes de pescado bioconservados con la cepa multibacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* BCS35 como cultivo protector y/o ingrediente alimentario mostraron recuentos menores que los de los lotes control. Asimismo, el análisis sensorial realizado por un experto tasador oficial de la lonja gallega de Marín permitió concluir que los lotes bioconservados alcanzarían un precio más alto en el mercado que los respectivos lotes control.
6. La inmunización de conejos con péptidos sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica de las curvacinas G14 y G15, conjugados a la molécula portadora KLH, posibilitó la obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada y elevada sensibilidad frente a estas bacteriocinas, lo que también permitió, mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA, detectar y cuantificar su presencia en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa multibacteriocinogénica salvaje *Lactobacillus curvatus* BCS35 y de las cepas recombinantes bacteriocinogénicas de *Lactococcus lactis* NZ9000 generadas en este trabajo. La temperatura de incubación influye en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus curvatus* BCS35, detectándose la máxima producción de las curvacinas G14 y G15 en los cultivos desarrollados en caldo MRS a 30 y 18°C, respectivamente.
7. La temperatura de incubación influye en la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus curvatus* BCS35, detectándose la máxima producción de las curvacinas G14 y G15 en los cultivos desarrollados en caldo MRS a 30 y 18°C, respectivamente.
8. La clonación de quimeras génicas que codifican el péptido señal de la proteína Usp45 fusionado a las bacteriocinas curvacina G14 y G15 maduras en el plásmido pNZ8048 bajo el control del promotor inducible de la nisina A, así como la transformación por electroporación de los vectores resultantes en *Lactococcus lactis* NZ9000, permitió la producción de curvacinas G14 y G15 biológicamente activas. La producción de las curvacinas G14 y G15 por las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* NZ9000 fue 20 y 4 veces superior, respectivamente, a la cuantificada para la cepa

multibacteriocinogénica salvaje *Lactobacillus curvatus* BCS35, lo que demuestra la eficacia de la estrategia genética y de las cepas recombinantes desarrolladas en este trabajo para la producción heteróloga de estas bacteriocinas.

XI.5. BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo.** 1991. Microbiological of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique (ISO 4832:1991). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo.** 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo.** 1999. Microbiology of food and feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO 6888-1:1999). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo.** 2003a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees Celsius (ISO 4833:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anónimo.** 2003b. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal y F. Leroi.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 309–324.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal y J. Barros-Velazquez.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1: 43–63.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cintas, L. M. y P. Casaus.** 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.* diciembre: 89–95.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández y P. E. Hernández.** 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes y M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 89–109, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.

- EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Bruselas, Bélgica.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2005c. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 223: 1–12.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.
- EFSA.** 2008a. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732: 1–15.
- EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato y T. Matsui.** 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López y N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Gram, L. y H. H. Huss.** 1996. Microbial spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–137.
- Holo, H., Ø. Nissen e I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49: S139–S150.
- Huss, H. H.** 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* N° 348.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. *Quorum sensing* controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Kullen, M. K., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell y T. R. Klaenhammer.** 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89: 511–516.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faid y A. Bouseta.** 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 295–310.
- Nes, I. F., M. Kjos y D. B. Diep.** 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 285–329, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Poyart, C., G. Quesnes y P. Trieu-Cuot.** 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 415–418.
- Ross, R. P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Settanni, L. y A. Corsetti.** 2008. Application of bacteriocins in vegetable food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123–138.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Benez, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet e I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.

- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Vaughan, A. V. G. H. Eijsink, T. F. O'sullivan, K. O'Hanlon y D. van Sinderen.** 2001. An anlysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., V. G. Eijsink y D. Van Sinderen.** 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194–7203.

CHAPTER XI

EXTENDED ABSTRACT

XI.1. INTRODUCTION

The fishing activity produces a highly perishable food products which are generally subjected to an extensive international trade. Therefore, adequate industries, preservation and transportation strategies, as well as sales and distribution networks capable of maintaining an acceptable standard of hygienic-sanitary quality and safety throughout the entire commercialization process are required. This is especially important in those fishing areas where the fleet works at great distance from its home port, as in the case of the Spanish fishing fleet and, specifically, the Galician fleet. The long periods of time elapsed during fish transportation provide abundant opportunities for microbial growth and cross-contamination from different sources, making the hygienic maintenance required for fish and seafood more difficult to achieve (Gram and Huss, 1996). Products brought to market in well preserved conditions generally yield higher prices in both wholesale and retail markets, and thus give better returns to the fish industry. Therefore, it is necessary to improve upon the manipulation and conservation of fish products. Immediately after capture, several chemical and biological changes take place in dead fish, which can ultimately lead to its rejection for human consumption because of its spoilage, which is the result of a whole series of changes brought about by the own fish enzymes (autolytic changes) and microorganisms (microbiological changes) (Huss, 1995). Most of the fish processing operations aim to slow down these processes so the fish reaches the consumer in optimal conditions. In this context, the research and development of new conservation techniques are essential for controlling the microbial loads in order to: (i) increase shelf-life; (ii) reduce physical, organoleptic and nutritional losses, and (iii) assure the quality and safety of the final product. With regard to this, biopreservation technology, which refers to the shelf-life extension and improvement of food safety by using microorganisms and/or their metabolites (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002), arises as an interesting and cost-effective strategy that combined with other technologies such as refrigeration, could become an effective alternative for preservation of fresh landed fish. (Leistner, 2000; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008)

During the last years, bacteriocins and bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) Lactic Acid Bacteria (LAB) have been the focus of extensive research due to their potential use as natural biopreservatives for a variety of foods including, milk and dairy products, meat and meat products, fermented vegetables and, to a lesser extent, fish and fish products (Hugas, 1998; Brillet *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Settanni and Corsetti, 2008; El Bassi *et al.*, 2009). In this respect, there are four main strategies to use bacteriocinogenic LAB and/or bacteriocins as food biopreservatives: (i) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* as a protective and/or starter culture; (ii) use of a substrate previously fermented by a wild or recombinant bacteriocin-producing strain as a food ingredient; (iii) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, and/or (iv) incorporation or immobilization of the bacteriocin in or onto packaging materials for development of bioactive food packaging (Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007). It should be noted that the development of biopreservation strategies for fish and fish products requires the identification of suitable LAB strains, preferably belonging to the autochthonous LAB microbiota of fish and its processing environments, since they would be already acclimatized to these habitats, and

therefore would be more competitive than LAB from other origins (Tahiri *et al.*, 2004; El Bassi *et al.*, 2009).

LAB constitute a heterogeneous group of microorganisms commonly isolated from food, which boost the development of organoleptic and rheological characteristics and/or increase the nutritional quality of food (Cintas and Casaus, 1998). Moreover, the preservation capability and enhancement of food safety by LAB is due to their ability to inhibit the development of a wide range of spoilage and food-borne pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* (Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2010). The main mechanisms of microbial antagonism of LAB are the competition for nutrients from the culture medium or the food substrate in which they develop, and the formation of organic acids (mainly lactic and acetic acids), with a concomitant drop in the pH. However, they also produce other antimicrobial metabolites including ethanol, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde, hydrogen peroxide and other oxygen-metabolites, benzoate, D-isomers of amino acids, reuterin and other non-proteinaceous compounds of small molecular size, and, finally, a heterogeneous group of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins, referred to as bacteriocins (Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2012). Historically, LAB have been associated with spontaneous and industrial food fermentations, and thus they are currently considered as safe microorganisms for human consumption, that is, they are awarded the GRAS status (Generally Recognized As Safe) or its European equivalent QPS status (Qualified Presumption of Safety) (EFSA, 2004; EFSA, 2005a, 2005b, 2005c; EFSA, 2008a; EFSA, 2011). In this context, bacteriocinogenic LAB and/or their antimicrobial peptides are getting great attention for their application as biopreservatives in the food industry as an additional barrier in the combined strategies of food preservation (hurdle technology). In this respect, this strategy would increase the shelf-life and safety of food, and reduce the use of chemical additives and the intensity of the technological treatments that might interfere negatively with the organoleptic characteristics and/or nutritional value of foods (Leistner, 2000; Cleveland *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2002; Brillet *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2010).

XI.2. OBJECTIVES

Considering the above mentioned information, the main goals of the present research work are the following: (i) isolation and identification of LAB of marine origin (fish, seafood and fish products) with antimicrobial activity against spoilage and food-borne pathogenic bacteria; (ii) assessment of the biotechnological potential and *in vitro* safety of the strain(s) with a wider antimicrobial activity spectrum, including the biochemical and genetic characterization of the bacteriocin(s); (iii) development of biopreservation strategies for fresh landed fish at laboratory and semi-industrial scales with selected (multi)bacteriocinogenic LAB of marine origin, and (iv) heterologous production of selected bacteriocins and detection and quantification of their production by the wild-type (multi)bacteriocinogenic LAB and the recombinant bacteria generated in this work by using microbiological and immunochemical assays. In order to achieve these general goals, the following partial objectives should be addressed:

1. Isolation and quantification of the total, LAB and enterococcal microbiota of a number of foods of marine origin (fish, seafood and fish products).
2. Identification and pre-selection of LAB of marine origin with direct and extracellular antimicrobial activity against several indicator microorganisms such as *L. monocytogenes* and other fish spoilage and pathogenic bacteria as *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as previously characterized bacteriocinogenic LAB from different food origins.
3. Taxonomic identification of the selected LAB with direct antimicrobial activity of marine origin.
4. Determination of the antimicrobial activity spectrum of the bacteriocinogenic LAB of marine origin against other spoilage and food-borne pathogenic bacteria such as *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*.
5. PCR evaluation of the presence of previously described enterocin structural genes in the bacteriocinogenic *Enterococcus* spp. strains of marine origin.
6. *In vitro* safety evaluation of the bacteriocinogenic *Enterococcus* spp. strains of marine origin.
 - 6.1. Evaluation of the susceptibility to several antibiotics used in human and veterinary medicine.
 - 6.2. PCR evaluation of the presence of the genetic determinants encoding virulence factors previously described in *Enterococcus* spp.
7. Assessment of the biotechnological potential and *in vitro* safety evaluation of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.1. PCR evaluation of the presence of structural genes encoding previously described bacteriocins in the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.2. Purification to homogeneity and molecular mass determination of the bacteriocin(s) from the supernatant(s) of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.3. Determination of the amino acid sequence of the purified bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.4. Genetic characterization of the bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.5. Determination of the specific antimicrobial activity of the purified bacteriocin(s) from the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
 - 7.6. *In vitro* safety evaluation of the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
8. Development of a biopreservation strategy for fresh landed fish at laboratory and semi-industrial scales using the selected (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) of marine origin.
9. Generation of polyclonal antibodies with specificity for the selected bacteriocin(s) to be used for their detection and quantification by immunoenzymatic assays (ELISAs).
10. Heterologous production of the selected bacteriocin(s) by *Lactococcus lactis*.

11. Evaluation by using microbiological and immunochemical techniques of bacteriocin production by the wild-type (multi)bacteriocinogenic(s) LAB(s) and the recombinant strain(s) generated in this work.

XI.3. RESULTS

In Chapter III, the isolation, antimicrobial spectrum and preliminary characterization of bacteriocinogenic LAB isolated from a wide variety of fish, seafood and fish products is described. The obtained results revealed a great variation in the LAB population frequencies, depending on the substrate and anatomic source. From the lactic microbiota, a total of 1,245 LAB isolates were randomly selected and assayed for direct antimicrobial activity by a stab-on-agar test (SOAT) (Cintas *et al.*, 1995) against 20 Gram-positive and Gram-negative spoilage and food-borne pathogens of relevance for the food industry. From those strains, a total of 197 LAB exerted direct antimicrobial activity when grown on solid media, showing a great heterogeneity in their antimicrobial spectra. Analysis of the selected 64 LAB for extracellular activity by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995) revealed that only 25 strains secreted heat-stable proteinaceous antimicrobial substances (*i.e.*, bacteriocins) in their cell-free culture supernatants. Biochemical characterization, polymerase chain reaction (PCR) analysis and/or DNA sequencing of the superoxide dismutase gene (*sodA*) (Poyart *et al.*, 2000) and/or 16S rRNA gene (*16S rDNA*) (Kullen *et al.*, 2000), and/or determination of their whole-cell protein profiles by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analyses of the 64 LAB isolates with direct antimicrobial activity showed that 46 strains belong to the genus *Enterococcus*, of which 24 were identified as *Enterococcus faecium*, and 22 as *Enterococcus faecalis*. From the 18 non-enterococcal strains, seven were identified as *Pediococcus pentosaceus*, five as *Weissella cibaria*, three as *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*, one as *Lb. sakei* subsp. *sakei*, one as *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, and one as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Interestingly, none of the *E. faecalis* isolates with direct antimicrobial activity was found to secrete bacteriocins under the stated experimental conditions assayed in this work. The 20 bacteriocinogenic enterococcal isolates were analyzed by PCR for detection of genes encoding previously described enterocins, which showed that 90% amplified, at least, one structural gene, with those encoding enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin P being the most prevalent (65 and 60%, respectively). Up to four target genes were simultaneously detected in a single strain, namely those encoding enterocin P, enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin Q. Moreover, preliminary safety evaluation of *E. faecium* isolates was carried out by detection of potential virulence factors, analysis of hemolysin and gelatinase production, and susceptibility testing to several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine. The obtained results demonstrated the suitability of fish, seafood and fish products as ecological niches for the isolation of LAB, including (multi)bacteriocinogenic strains, mainly enterococci, encoding previously described or, to a lesser extent, unknown broad antimicrobial spectrum bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and other spoilage and food-borne pathogenic microorganisms of interest for the food industry.

From the 25 bacteriocinogenic LAB (20 *E. faecium*, 4 *Lactobacillus* spp. and 1 *P. pentosaceus*), *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 and *Lb. curvatus* BCS35 were selected for further characterization because of their broad antimicrobial spectrum and strong inhibitory activity against *L. monocytogenes*. In Chapter IV, PCR analysis with specific primers for curvacin A (CurA), sakacin P (SakP), and sakacin Q (SakQ) structural genes (*curA*, *sppA* and *sppQ*, respectively) were carried out for these lactobacilli revealing that *Lb. curvatus* BCS35 was the only strain that amplified *sppA* and *sppQ*. Comparative bacteriocin activity of the bacteriocins produced by *Lb. curvatus* BCS35, *Lb. sakei* LTH673 (SakP-producer) (Tichaczek *et al.*, 1992) and *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1[PedPA-1]-producer) (Cintas *et al.*, 1998) against *Listeria* spp. and LAB strains was determined by an ADT (Cintas *et al.*, 1997) and a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000). By using a multichromatographic purification procedure including ammonium sulphate precipitation, gel filtration, cation exchange and hydrophobic interaction chromatographies, and reverse-phase liquid chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC) (Casaus *et al.*, 1997), it was determined that the antimicrobial activity of *Lb. curvatus* BCS35 is due to the production of, at least, two bacteriocins. Both purified peptides, termed curvacin G14 (CurG14) and curvacin G15 (CurG15), were subjected to mass spectrometry analysis, revealing that they are 4,460.9 and 4,362.3 Da in size, respectively. N-terminal amino acid and/or nucleotide sequencing showed that CurG14 and CurG15 are very similar or identical to the class IIa bacteriocins SakP, previously identified in *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992), and sakacin X (SakX), firstly described in *Lb. sakei* 5 (Vaughan *et al.*, 2001, 2003), respectively. In fact, CurG14 only differs from SakP at position 12 (Tyr instead of His), which is in agreement with their differences in molecular mass (4,460.9 and 4,435.0 Da, respectively). Purified CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP, and PedPA-1 were challenged against several strains of *Listeria* spp. and LAB in order to: (i) compare their specific antimicrobial activities, and (ii) determine if the substitution Tyr12/His12 in CurG14/SakP exerts any effect on the bacteriocin potency and/or specificity. Finally, the *in vitro* safety of *Lb. curvatus* BCS35 was determined by susceptibility testing against several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine and analysis of hemolysin, gelatinase and protease activities.

In Chapter V, the development of a biopreservation strategy for fresh landed fish based on the use of multibacteriocinogenic LAB of marine origin is described. For this purpose, two multiple bacteriocin-producing LAB strains, *Lb. curvatus* BCS35 and *E. faecium* BNM58, previously isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*) and albacore (*Thunnus alalunga*), respectively (Chapter III), were selected due to their capability to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and several fish-spoilage microorganisms of relevance for the food industry such as *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*. Two commercially important fish species were chosen for this study, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus bosci*), and the specimens were acquired at the Marín (Pontevedra, Spain) retail fish market, after one night in the chilled hold of a near-shore fishing vessel. The biopreservation potential and the application strategies of these two multibacteriocinogenic LAB strains were first tested at a laboratory scale, where several batches of fresh landed fish were inoculated with: (i) the multibacteriocinogenic LAB culture as protective culture; and/or

(ii) their cell-free culture supernatant as food ingredient, and (iii) the lyophilized bacteriocin preparation as lyophilized food ingredient. All batches were stored in polystyrene boxes, permanently filled with ice at 0–2°C, for 14 days. Microbiological analyses, including counts of aerobic mesophiles (Anonymous, 2003a), standard coliforms (Anonymous, 1991), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Anonymous, 2003b), coagulase-positive staphylococci (Anonymous, 1999), *Clostridium* spp. and *Listeria* spp. (Anonymous, 1996), as well as sensorial analyses including general appearance, skin (slime), gills color and odor, eye morphology and peritoneum adherence, were carried out during the biopreservation trials. Subsequently, *Lb. curvatus* BCS35 was selected to up-scale the trials, and combinations of the three application methods were assayed. For this purpose, this multibacteriocinogenic LAB was grown in a semi-industrial scale fermentor in modified MRS broth, and three batches of fresh landed fish were inoculated with the resulting protective culture and/or food ingredient, and stored on ice in a chilled chamber at 0–2°C at the Marín retail fish market for 14 days. Microbiological analyses cited above were carried out during the storage period, showing that when *Lb. curvatus* BCS35 culture or the corresponding cell-free culture supernatant was used as protective culture or food ingredient, respectively, bacterial counts were significantly lower than those of the control batches, both for young hake and megrim. Moreover, the presence of *Listeria* spp. in the biopreserved megrim specimens was inhibited in both analyses. Finally, the effect of the protective culture and the food ingredient on the sensory characteristics of fish was evaluated by an official fish appraiser from the Marín retail fish market, who concluded that all the biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than the respective control batches, demonstrating that the multibacteriocinogenic LAB of marine origin *Lb. curvatus* BCS35 may be considered as a suitable candidate for its application as fresh landed fish biopreservative.

The broad antimicrobial spectrum of the bacteriocins CurG14 and CurG15 produced by *Lb. curvatus* BCS35 (Chapter III), which are partially responsible for the antimicrobial activity exerted by this multiple bacteriocin producer (Chapter IV), as well as the *in vivo* demonstration of the good performance of these bacteriocins and their producer strain in the biopreservation of fresh landed fish (Chapter V), prompted interest in the development of heterologous hosts which could improve bacteriocin antimicrobial activity and/or production. In this respect, Chapter VI describes the heterologous production of CurG14 and CurG15 by *Lactococcus lactis*, as well as their microbiological and immunochemical detection and quantification in the wild-type and the recombinant producer strains. For this purpose, chimeric genes encoding fusions of the signal peptide of the Usp45 (SP_{Usp45}) protein to the mature CurG14 and CurG15 bacteriocins were cloned into the pNZ8048 vector (Kuipers *et al.*, 1998) under control of the nisin A-inducible promoter (P_{nisA}), generating the plasmids pNUG14E and pNUG15E, respectively. These plasmids were transformed into *Lc. lactis* NZ9000, resulting in several recombinant strains from which *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) were selected for further characterization. Mass spectrometry analyses of CurG14 and CurG15 purified from the supernatants of the selected recombinant strains showed that both peptides were correctly processed and secreted. Antimicrobial activity and bacteriocin production of the recombinant strains were detected and quantified in cell-free culture supernatants from cultures induced with nisin A (NisA) at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.3, 0.5 and 0.9, and further grown for 1.5,

3 and 5 h, and compared with those present in the supernatants from *Lb. curvatus* BCS35 cultures grown at 4, 8, 18, 25, 30 and 37°C. The maximum antimicrobial activity of the selected recombinant strains *Lc. lactis* NZ9000-69E (pNUG14E) and *Lc. lactis* NZ9000-12E (pNUG15E) (2,430 and 22,843 BU/ml, respectively) was found at an OD₆₀₀ of 0.5, and 3 h after induction. Likewise, quantification of the recombinant bacteriocins by using a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) and the specific anti-CurG14 and anti-CurG15 polyclonal antibodies generated in this work showed that these conditions also resulted in the maximum production of both bacteriocins (4,896 and 17,149 ng/ml of CurG14 and CurG15, respectively). Interestingly, these concentrations represent a 20- and a 4-fold increase in the production of CurG14 and CurG15, respectively, with respect to the maximum production quantified in the wild-type producer *Lb. curvatus* BCS35, demonstrating the usefulness of the genetic procedure and the recombinant strains generated in this work for the heterologous production of these bacteriocins showing a broad antimicrobial spectrum against food spoilage and pathogenic bacteria of relevance for the food industry.

XI.4. CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this research work are the following:

1. Fish, seafood and fish products constitute a suitable source for the isolation of Lactic Acid Bacteria with antimicrobial activity. From 1,245 Lactic Acid Bacteria evaluated in this work, isolated from 16 samples of fish, seafood and fish products, 197 strains showed direct antimicrobial activity, which represent a 15.8%; from these, 158 strains, which represent a 12.7% of the total Lactic Acid Bacteria, inhibited the growth of, at least, one of the tested *Listeria monocytogenes* strains. From the 64 selected Lactic Acid Bacteria, 25 strains, which represent a 39.1%, showed extracellular antimicrobial activity due to the production of heat-stable bacteriocins with heterogeneous inhibitory spectra.
2. The 64 selected Lactic Acid Bacteria with antimicrobial activity were taxonomically identified as *Enterococcus faecium* (24 strains; 37.5%), *Enterococcus faecalis* (22 strains; 34.4%), *Pediococcus pentosaceus* (7 strains; 10.9%), *Weissella cibaria* (5 strains; 7.8%), *Lactobacillus sakei* (4 strains; 6.3%), *Lactobacillus curvatus* (1 strain; 1.6%) and *Leuconostoc mesenteroides* (1 strain; 1.6%). The 25 bacteriocinogenic strains were identified as *Enterococcus faecium* (20 strains), *Lactobacillus sakei* (3 strains), *Lactobacillus curvatus* (1 strain) and *Pediococcus pentosaceus* (1 strain).
3. The polymerase chain reaction (PCR) allowed the detection of previously described enterocin structural genes in 18 out of the 20 bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains, with those encoding enterocin L50 (L50A and L50B) and enterocin B being the most prevalent (65 and 60%, respectively), either alone or in combination with other enterocin structural genes.
4. The strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*), may be considered a safe strain that displays a broad and strong antimicrobial activity spectrum against spoilage and food-borne pathogenic microorganisms of concern for the food industry, mainly *Listeria monocytogenes*, due to the production of, at least, two class IIa bacteriocins: (i) curvacin

G14, a sakacin P variant containing a tyrosine residue instead of histidine residue at position 12 of the mature bacteriocin, and (ii) curvacin G15, a bacteriocin identical to sakacin X. Moreover, the genes encoding the bacteriocins sakacin T (SakT α and SakT β) and sakacin Q were also detected in the genome of *Lactobacillus curvatus* BCS35.

5. This work describes for the first time the efficiency of the use of bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and/or their bacteriocins as biopreservatives for fresh fish, young hake (*Merluccius merluccius*) and megrim (*Lepidorhombus boscii*), during their refrigerated storage for 14 days. Microbiological analyses of fish batches biopreserved with the multibacteriocinogenic strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, as protective culture and/or food ingredient, showed lower counts than those of the control batches. Besides, the sensorial evaluation carried out by an official fish appraiser from the Galician Marín retail fish market allowed to conclude that biopreserved batches were worth a higher price in the fish market than their respective control batches.
6. Immunization of rabbits with chemically synthesized peptides derived from the amino acid sequence of curvacins G14 and G15, conjugated to the carrier protein KLH, permitted the generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity and suitable sensitivity against these bacteriocins, which also allowed, by using ELISA immunoenzymatic assays, their detection and quantification in culture supernatants from the multibacteriocinogenic wild-type strain *Lactobacillus curvatus* BCS35 and the *Lactococcus lactis* NZ9000 bacteriocinogenic recombinant strains.
7. Growth temperature influences bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* BCS35, being curvacin G14 and G15 maximally produced by cultures grown in MRS broth at 30 and 18°C, respectively.
8. The use of genetic chimeras encoding the signal peptide of Usp45 fused to the mature curvacins G14 and G15 into the expression vector pNZ8048 under control of the inducible nisin A promoter, and the transformation by electroporation of the resulting plasmids in *Lactococcus lactis* NZ9000 cells, permitted the production of biologically active curvacins G14 and G15. The production of curvacins G14 and G15 by the recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 strains was 20- and 4-fold higher, respectively, than the production quantified for the multibacteriocinogenic wild-type strain *Lactobacillus curvatus* BCS35, which demonstrates the efficiency of the genetic strategy and the recombinant strains developed in this work for the heterologous expression of these bacteriocins.

XI.5. REFERENCES

- Anonymous.** 1991. Microbiological of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique (ISO 4832:1991). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anonymous.** 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.

- Anonymous.** 1999. Microbiology of food and feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO 6888-1:1999). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anonymous.** 2003a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees Celsius (ISO 4833:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Anonymous.** 2003b. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579:2003). International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal, and F. Leroi.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 309–324.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal, and J. Barros-Velazquez.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1: 43–63.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cintas, L. M. and P. Casaus.** 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.* December: 89–95.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross.** 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. In: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 89–109, 1st edition. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Bruselas, Bélgica.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2005c. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 223: 1–12.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.

- EFSA.** 2008a. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732: 1–15.
- EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 9: 1–82.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato, and T. Matsui.** 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 74: M335–339.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Gram, L. and H. H. Huss.** 1996. Microbial spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–137.
- Holo, H., Ø. Nissen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49: S139–S150.
- Huss, H. H.** 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* No. 348.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1998. *Quorum sensing* controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Kullen, M. K., R. B. Sanzky-Dawes, D. C. Crowell, and T. R. Klaenhammer.** 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89: 511–516.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faïd, and A. Bouseta.** 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 295–310.
- Nes, I. F., M. Kjos, and D. B. Diep.** 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 285–329, 4^a edition. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, USA.
- Poyart, C., G. Quesnes, and P. Trieu-Cuot.** 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 415–418.
- Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Settanni, L. and A. Corsetti.** 2008. Application of bacteriocins in vegetable food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123–138.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Tahiri, I., M. Desbiens, R. Bénéch, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet, and I. Fliss.** 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 123–136.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Vaughan, A. V. G. H. Eijssink, T. F. O’sullivan, K. O’Hanlon, and D. van Sinderen.** 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., V. G. Eijssink, and D. Van Sinderen.** 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194–7203.

APÉNDICES

Listado de abreviaturas y acrónimos

Código genético

Listado de enzimas de restricción
y secuencias diana específicas

Glosario

Listado de tablas

Listado de figuras

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES

A_x	Absorbancia o densidad óptica a una longitud de onda "x"
aa	Aminoácido(s)
ABC	Transportador del tipo ABC (del inglés <i>ATP Binding Cassette</i>)
ABTS	Reactivo ABTS (del inglés <i>2,2'-Azino-bis [3-ethylBenzThiazoline-6-Sulfonic acid]</i>)
Ace	Adhesina Ace o adhesina del colágeno (del inglés <i>Adhesin of Collagen from E. faecalis</i>)
ACE	Enzima de conversión de la angiotensina (del inglés <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato (del inglés <i>Adenosine Di-Phosphate</i>)
ADT/TDA	Prueba de difusión en agar (del inglés <i>Agar Diffusion Test</i>)
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación
AG	Aparato de Golgi
Amp	Ampicilina
AMP	Adenosín monofosfato (del inglés <i>Adenosine Mono-Phosphate</i>)
APPCC/HACCP	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (<i>Hazard Analysis Critical Control Point</i>)
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (del inglés <i>Amplified rDNA Gene Restriction Analysis</i>)
ARE	Enterococos resistentes a antibióticos (del inglés <i>Antibiotic Resistant Enterococci</i>)
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	Molécula de ARN mensajero
ARNr	Molécula de ARN ribosómico
ARNt	Molécula de ARN transferente
AS	Adhesina AS o sustancia de agregación (del inglés <i>Aggregation Substance</i>)
ATP	Nucleótido adenosina trifosfato (del inglés <i>Adenosine Tri-Phosphate</i>)
ATPasa	Enzima/proteína con actividad ATPasa
Aur	Aureocina
Bav	Bavaricina
BP	Medio de cultivo Baird-Parker
C-	Grupo carboxilo
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CB	Del inglés <i>Coating Buffer</i>
Cbn	Carnobacteriocina
CCAA	Comunidades Autónomas
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFPO	Censo de la Flota Pesquera Operativa
Cir	Circularina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CNS	Estafilococos coagulasa-negativos (del inglés <i>Coagulase Negative Staphylococci</i>)
Col	Colicina
CTN	Comité Técnico de Normalización

Cur	Curvacina
Cyl	Citolisina o hemolisina β /bacteriocina
DEFT	Técnica de epifluorescencia directa sobre filtro (del inglés <i>Direct Epifluorescent Filter Technique</i>)
DG SANCO	Dirección General para la Protección de la Salud y el Consumidor de la Comisión Europea (del inglés <i>Directorate Generale for Health and Consumers</i>)
DHA	Ácido docosahexaenoico
Div	Divergicina
DMA	Dimetilamina
DO_x/OD_x	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda "x"
DTS	Sistema de transporte dedicado (del inglés <i>Dedicated Transport System</i>)
EBS	Sustancia de unión enterococal (del inglés <i>Enterococcal Binding Substance</i>)
EE	Caldo de Enriquecimiento de <i>Enterobacteriaceae</i>
EII_t^{Man}	Sistema fosfotransferasa (PTS) manosa-específico
EII_t^{Bgl}	Sistema fosfotransferasa (PTS) glucósido-específico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ELISA (del inglés <i>Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay</i>)
ELISA-NCI	Ensayo ELISA no competitivo indirecto
Enl	Enterolisina
Ent	Enterocina
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPS	Exopolisacárido
Esp	Adhesina Esp o proteína extracelular superficial (del inglés <i>Extracellular Surface Protein</i>)
EVA	Medio de cultivo EVA (del inglés <i>Ethyl Violet Azide</i>)
FA	Formaldehido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FEEDAP	Del inglés <i>Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed</i>
FIA	Análisis de inyección del flujo (del inglés, <i>Flow Injection Analysis</i>)
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GAP	Promotor GAP (del inglés <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
Gas	Gassericina
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>)
GRAVY	Grado de hidrofobicidad de una proteína (del inglés <i>Grand Average of Hydropathicity</i>)
G+C	Contenido de bases guanina y citosina (mol%)
Hx	Hipoxantina
HxR	Inosina
HPK	Proteína HPK o proteína histidín-quinasa (del inglés <i>Histidin Protein Kinase</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICES	Consejo Internacional para la Explotación del Mar (del inglés <i>International Council for the Exploration of the Sea</i>)

IDF	Del inglés <i>International Dairy Federation</i>
IMP	Inosina monofosfato
IP	Péptido o factor inductor (del inglés <i>Induction Peptide</i>)
ISO	Del inglés <i>International Organization for Standardization</i>
ISSCAAP	Del inglés <i>International Standard Statistical Classification for Aquatic Animals and Plants</i>
KAA	Medio de cultivo KAA (del inglés <i>Kanamycin Aesculin Azide</i>)
Kan	Kanamicina
LAB	Bacterias lácticas (del inglés <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
Las	Lactocina S
Lci	Lactococcina
Leu	Leucocina
Lta	Lactacina
Ltn	Lacticina
MALDI-TOF-MS	Análisis mediante espectrometría de masas
MAP	Envasado en atmósfera modificada (del inglés <i>Modified Atmosphere Packaging</i>)
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MCS/CDW	Masa celular seca / <i>Cell Dry Weight</i>
MDR	Transportador del tipo MDR o de resistencia a múltiples antibióticos (del inglés <i>Multidrug Resistance</i>)
MED	Microorganismos Específicos del Deterioro (del inglés, <i>Specific Spoilage Organisms</i>)
Mes	Mesentericina
Met	Metionina
MFα1_s	Señal de secreción de la feromona factor α 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (del inglés, <i>Mating Pheromone α-factor 1 Secretion Signal</i>)
M_M	Masa molecular
MMCF	Técnica de fluorescencia de microcolonias sobre filtros de membrana (del inglés <i>Membrane Filter Microcolony Fluorescence Method</i>)
MPA	Ensayo en placas microtituladoras (del inglés <i>Mitrotiter Plate Assay</i>)
MRS	Medio de cultivo MRS (del inglés <i>Man, Rogosa and Sharpe</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la metilicina (del inglés <i>Methillicin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
MUG	Del inglés <i>4-Methyl-Umbeliferil-β-D-Glucuronide</i>
MYGP	Medio de cultivo MYGP
m/vol	Relación masa/volumen
N-	Grupo amino
NBS	Región de unión a nucleótidos (del inglés <i>Nucleotide-Binding Sites</i>)
N-BVT	Nitrógeno Básico Volátil Total
NICE	Sistemas de expresión controlados por la nisina A (del inglés <i>Nisin Controlled Expression</i>)
Nis	Nisina
NNP	Nitrógeno no proteico
NSLAB	Flora NSLAB o flora láctica que no forma parte del cultivo iniciador (del inglés <i>Non-Starter Lactic Acid Bacteria</i>)
OMC	Organización Común de Mercados

orf	Gen hipotético o marco de lectura abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
ORF	Proteína hipotética codificada por un <i>orf</i>
OTMA	Óxido de trimetilamina
PA	Proteína accesoria
PCA	Medio de cultivo PCA (del inglés <i>Plate Count Agar</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ped	Pediocina
pI	Punto isoelectrico
PIB	Producto Interior Bruto
Plt	Plantaricina
PME	Proteína de membrana externa de las bacterias Gram-negativas
PMF	Fuerza protón-motriz (del inglés <i>Proton Motive Force</i>)
PPC	Política Pesquera Común
Psc	Piscicolina
PTS	Sistema PTS o sistema fosfotransferasa (del inglés <i>PhosphoTransferase System</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>PolyVinylidene DiFluoride</i>)
Pw	Agua de peptona (del inglés <i>Peptone water</i>)
QPS	Presunción qualificada de seguridad (del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RMS	Rendimiento Máximo Sostenible
RND	Superfamilia de reguladores y de proteínas de membrana (del inglés, <i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>)
RR	Proteína RR o proteína reguladora de respuesta (del inglés <i>Response Regulator</i>)
RTE	Alimentos listos para el consumo (del inglés <i>Ready-To-Eat</i>)
RV	Medio de cultivo Rappaport-Vissiliadis
Sak	Sakacina
SB	Medio de cultivo SB (del inglés <i>Slanetz and Barley</i>)
SC	Medio de cultivo mínimo para el crecimiento de <i>Sc. cerevisiae</i>
SCAN	Del inglés <i>Scientific Committee on Animal Nutrition</i>
SCGR	Medio de cultivo SC suplementado con galactosa y rafinosa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Sec	Sistema Sec-dependiente o Ruta General de Secreción
SOAT	TISP o técnica de inhibición por siembra en picadura (del inglés <i>Stab-On-Agar Test</i>)
SOFIA	Del inglés <i>The State of World Fisheries and Aquaculture</i>
SOS	Respuesta SOS o sistema de reparación de membrana
SP	Péptido señal (del inglés <i>Signal Peptide</i>)
SPS	Medio de cultivo SPS (del inglés sulfite polymyxin sulfadiazine)
SPAT	Técnica de inhibición por gota sobre agar (del inglés <i>Spot-On-Agar Test</i>)
SRP	Partícula reconocedora de señal (del inglés <i>Signal Recognition Particle</i>)
SS	Medio de cultivo para <i>Salmonella-Shigella</i>
TAC	Total Admisible de Capturas
TFA	Ácido trifluoroacético

TMA	Trimetilamina
TMD	Dominios transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Domains</i>)
TMS	Segmentos transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Segment</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
TPI	Promotor TPI (del inglés <i>Triose Phosphate Isomerase</i>)
UE	Unión Europea
UP	Unidad de pasteurización
UV	Ultravioleta
VRBD	Medio de cultivo VRBD (del inglés <i>Violet Red Bile Dextrose</i>)
VRBL	Medio de cultivo VRBL (del inglés <i>Violet Red Bile Lactose</i>)
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin Resistant Enterococci</i>)
XLD	Medio de cultivo XLD (del inglés <i>Xylose-Lysine Deoxycholate</i>)
Zeo	Zeocina
vol/vol	Relación volumen/volumen
wt/vol	Relación masa/volumen
WHO/OMS	Organización Mundial de la Salud (del inglés <i>World Health Organization</i>)
ZEE	Zona Económica Exclusiva

2. ABREVIATURAS DE UNIDADES

Da	Dalton
hl	Hectolitros
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
kDa	Kilodalton
l	Litros
mg	Miligramos
ng	Nanogramos
pb/bp	Pares de bases
ppm	Partes por millón
tm	Toneladas
UA	Unidad arbitraria
UB/BU	Unidad de bacteriocina/Bacteriocin unit
ufc/cfu	Unidad formadora de colonia/Colony forming unit

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS

B.	<i>Bacillus</i> spp.
Br.	<i>Brochothrix</i> spp.
C.	<i>Carnobacterium</i> spp.
Cl.	<i>Clostridium</i> spp.
E.	<i>Enterococcus</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Escherichia</i> spp., por ej.: <i>E. coli</i>)
H.	<i>Helicobacter</i> spp.
L.	<i>Listeria</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Lepidiorhombus</i> spp., por ej.: <i>L. boscii</i>)
Lb.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Lc.	<i>Lactococcus</i> spp.
Le.	<i>Leuconostoc</i> spp.
O.	<i>Oenococcus</i> spp.
P.	<i>Pediococcus</i> spp.
Pc.	<i>Pichia</i> spp.
Ph.	<i>Photobacterium</i> spp.
Pr.	<i>Propionibacterium</i> spp.
Ps.	<i>Pseudomona</i> spp.
R.	<i>Rhizopus</i> spp.
S.	<i>Salmonella</i> spp.
Sc.	<i>Saccharomyces</i> spp.
Sh.	<i>Shewanella</i> spp.
St.	<i>Staphylococcus</i> spp.
Str.	<i>Streptococcus</i> spp.
W.	<i>Weissella</i> spp.
Z.	<i>Zymomonas</i> spp.

4. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS

A (AMP)	Adenina monofosfato o ácido adenílico
C (CMP)	Citosina monofostato o ácido citidílico
G (GMP)	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
T (TMP)	Timidina monofosfato o ácido timidílico
U (UMP)	Uridina monofosfato o ácido uridílico

B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
K	G o T
M	A o C
N	A o C o G o T
R	A o G
S	C o G
V	A o C o G
W	A o T
Y	C o T

5. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraducionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraducionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	
Dehidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO

U		C		A		G	
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	Tercera posición (extremo 3')
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }	C	
		UUA } Leu	UCA }	UAA *	UGA *	A	
		UUG }	UCG }	UAG *	UGG } Trp	G	
	C	CUU }	CCU }	CAU } His	CGU }	U	
		CUC } Leu	CCC }	CAC }	CGC }	C	
		CUA }	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }	G	
	A	AUU }	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC } Ile	ACC }	AAC }	AGC }	C	
		AUA }	ACA }	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG } Met	ACG }	AAG }	AGG }	G	
	G	GUU }	GCU }	GAU } Asp	GGU }	U	
		GUC } Val	GCC }	GAC }	GGC }	C	
		GUA }	GCA }	GAA } Glu	GGA }	A	
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }	G	

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.

APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS

Enzima	Secuencia diana ^a
<i>BspHI</i>	T▼CATGA AGTAC▲T
<i>KpnI</i>	GGTAC▼C C▲CATGG
<i>NcoI</i>	C▼CATGG GGTAC▲C
<i>SacI</i>	GAGCT▼C C▲TCGAG

^aEl sitio de restricción se indica con el símbolo ▼.

APÉNDICE 4. GLOSARIO

Acuicultura	Actividad que tiene por objeto la producción de recursos hidrobiológicos organizada por el hombre. Comprende la cría de peces y crustáceos o cultivo de plantas en estanques, jaulas u otras formas de confinamiento en agua dulce o salada que permite recolectar directamente el producto.
Aditivos	Sustancias que se añaden intencionadamente a los productos alimenticios sin propósito de cambiar su valor nutritivo y con la finalidad de modificar sus características y técnicas de elaboración y conservación y/o para mejorar su adecuación para el empleo al que se destinan. Dichas sustancias, posean o no valor nutritivo, no se consumen normalmente como alimentos ni se usan como ingredientes característicos de los mismos.
ADN complementario	ADN monocatenario sintetizado <i>in vitro</i> a partir de un molde de ARNm empleando una ADN polimerasa ARN-dependiente.
ADN polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN mediante la adición de desoxinucleótidos trifosfato en sentido 5'-3' a un cebador de ARN o ADN utilizando como molde una cadena de ADN complementario.
Afloramiento	Proceso por el cual aguas profundas frías y ricas en nutrientes, ascienden a la superficie. También se conoce como <i>upwelling</i> o <i>bloom</i> .
Aguas interiores	Son aquellas aguas situadas al interior de la línea de base del mar territorial.
Agrupación génica	Conjunto de operones cuyos productos génicos intervienen en la misma función biológica.
Anádromo	Son aquellas especies de peces cuyo ciclo de vida se inicia en agua dulce, posteriormente migran al mar donde crecen y se desarrollan hasta alcanzar su madurez sexual, etapa en que vuelven a sus cursos de origen completando su ciclo con el proceso reproductivo.
Anfidromo	Son aquellas especies de peces que para completar su ciclo de vida deben de desplazarse aguas abajo hasta la desembocadura en el mar. Los adultos de estas especies nunca abandonan el agua dulce, pero sus larvas tienen una etapa de vida marina planctónica y los juveniles regresan al agua dulce para crecer y madurar sexualmente.
Aparejo de pesca	Sistema o artificio de pesca preparado para la captura de recursos hidrobiológicos, formado por líneas o cabos con anzuelos o con otros útiles que, en general, sean aptos para dicho fin, pero sin utilizar paños de redes.
ATPasa	Enzima que cataliza la hidrólisis de la adenosina trifosfato (ATP), liberando adenosina difosfato y fosfato inorgánico.
Bacteriocina	Péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática).

Bacteriocinogenicidad	Capacidad de producir bacteriocinas.
Bentos	El bentos o sistema bentónico está constituido por el conjunto de organismos marinos adaptados a vivir sobre el fondo acuático, donde permanecen fijos o libres y errantes. Las especies de peces bentónicos son en general de carne magra y tienen forma aplanada. Algunos ejemplos son el lenguado, el gallo o el rodaballo.
Bioconservación	Técnica de conservación de los alimentos definida como “la prolongación de la vida útil e incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales para la salud de los consumidores”.
Bioteología	Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.
Caladero	Zonas marinas donde concurren circunstancias favorables y se pueden encontrar permanentemente determinados <i>stocks</i> con interés pesquero.
Catádro	Son aquellas especies de peces cuyo ciclo de vida se inicia en el mar, lugar desde donde migran a lugares de agua dulce, en donde crecen y se desarrollan hasta volver a las aguas de origen cuando han alcanzado su madurez sexual, donde completan el proceso reproductivo.
Cebador	Oligonucleótido empleado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Cefalópodo	Los cefalópodos (del griego <i>kephalé</i> , cabeza y <i>podós</i> , pie) son moluscos con tentáculos y una gran cabeza. Pertenecen a este grupo los calamares, pulpos y sepias.
Colicina	Bacteriocina producida por <i>Escherichia coli</i> cuyo tamaño molecular es de 25–80 kDa.
Compuestos ionóforos	Compuestos hidrofóbicos que se introducen en la membrana celular y aumentan su permeabilidad a ciertos iones.
Conjugación	Proceso de transferencia de moléculas de ADN plasmídico de una célula bacteriana a otra.
Crustáceos	Son un extenso subfilo de artrópodos de respiración branquial, que cuentan con dos pares de antenas y un número variable de apéndices, y que se encuentran recubiertos de un caparazón generalmente calcificado. La mayor parte de ellos son acuáticos, habitando en agua dulce y salada y a todas las profundidades.
Cultivo adjunto	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial con una finalidad distinta a la de los cultivos iniciadores y protectores (acelerar la maduración y producir el sabor/aroma deseado).
Cultivo iniciador	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para modificar, mejorar y estandarizar sus características organolépticas y reológicas.

Cultivo probiótico	Cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras), y componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y en el bienestar del hospedador, en algunos casos como consecuencia de la mejora de las propiedades de su microflora indígena.
Cultivo protector	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para asegurar su calidad higiénico-sanitaria y seguridad e incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes.
Demersal	Las especies demersales son aquellas que viven cerca del fondo del mar. Estos peces, en general, presentan poco movimiento y se mantienen en contacto con el fondo, pero pueden efectuar movimientos migratorios según sus necesidades alimenticias o su ciclo de vida.
Diádromo	Aquellas especies migratorias cuyo ciclo de vida transcurre entre agua salada y agua dulce o viceversa. Pueden clasificarse como especies anádromas, catádromas o anfídromas.
Dominio	Región de una molécula de proteína o ADN que posee una función o conformación específica.
Efecto sinérgico	Se produce cuando la utilización combinada (ratio 1:1) de dos bacteriocinas permite obtener una actividad antimicrobiana mayor que la correspondiente al efecto aditivo de las bacteriocinas evaluadas independientemente.
Episoma	Elemento genético bacteriano que puede replicarse independientemente del cromosoma bacteriano o integrarse y replicarse como parte del cromosoma.
Esfuerzo de pesca	Acción desarrollada por una unidad de pesca durante un tiempo definido y sobre un recurso hidrobiológico determinado.
Expresión génica	Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.
Extensión N-terminal	Secuencia de 15–30 aminoácidos localizada en la región N-terminal de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que será eliminada durante o tras el proceso de secreción de la proteína a través de la membrana citoplasmática.
Factor de virulencia	Molécula efectora que potencia la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.
Feromona	Sustancia pseudohormonal secretada por un organismo a modo de señal específica para otro organismo, generalmente de la misma especie.
Feromona sexual	Feromona secretada por células bacterianas cuya actividad biológica es el desencadenamiento del proceso de conjugación plasmídica.

Flora NSLAB	Conjunto de microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador empleado durante la elaboración del alimento.
Fuerza protón motriz	Gradiente electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía.
Gen	Segmento de ADN que codifica un péptido, una proteína o una molécula de ARN.
Ictiófago	Se aplica al animal que se alimenta de peces.
Levaduras	Hongos, generalmente unicelulares, que se reproducen vegetativamente por gemación. <i>Saccharomyces</i> es uno de los aproximadamente 40 géneros de levaduras ascoporógenas que se conocen, en el que se incluyen siete especies, entre las que se encuentran las levaduras más habitualmente utilizadas en la industria alimentaria (<i>i.e.</i> , <i>Sc. cerevisiae</i>).
Metabolito primario	Producto del metabolismo bacteriano generado durante la fase exponencial de crecimiento.
Metabolito secundario	Producto del metabolismo bacteriano, no esencial para el crecimiento o el mantenimiento de las funciones celulares, generado durante la fase estacionaria de crecimiento.
Microcina	Bacteriocina producida por <i>E. coli</i> , cuyo tamaño molecular es <10 kDa.
Molécula docking	Molécula que facilita la interacción de las bacteriocinas con sus diana(s) celular(es).
Moluscos	Los moluscos (del latín <i>molluscum</i> , blando) son un amplio grupo de invertebrados de cuerpo blando y que están presentes en agua salada, agua dulce y hábitats terrestres. La mayoría de los moluscos tienen un pie muscular y una concha calcárea que protege el cuerpo blando, como por ejemplo las almejas, los berberechos, los mejillones o los caracoles; sin embargo, algunos como el calamar o el pulpo no tienen este tipo de concha.
Nivel trófico	El nivel trófico de un organismo es su posición dentro de la cadena alimentaria. Los niveles se enumeran según lo lejos que se sitúen unos organismos concretos dentro de la cadena alimentaria, desde los productores primarios (plantas) en el nivel 1, pasando por los herbívoros (nivel 2), los depredadores (nivel 3), hasta los carnívoros o grandes carnívoros (nivel 4 ó 5).
Número de copias	Número de repeticiones de un determinado plásmido que contiene una célula.
Operón	Conjunto de genes transcritos bajo el control de un único promotor, cuyos productos intervienen en la misma función biológica.
Peces ciclóstomos	Los agnatos o ciclóstomos (del griego <i>kýklos</i> , círculo y <i>stóma</i> , boca) son peces de cuerpo largo y cilíndrico, esqueleto cartilaginoso, piel sin escamas, con seis o siete pares de branquias y boca circular, a modo de ventosa, con la que se sujetan a otros peces para succionar sus alimentos. A este grupo pertenece la lamprea.
Peces cartilaginosos	Los condriktios o peces cartilaginosos se caracterizan por poseer hendiduras branquiales externamente visibles y un esqueleto compuesto solo de cartílago. En este grupo se incluyen las rayas y los tiburones.

Peces óseos	Los osteíctios o peces óseos son aquellos que poseen un esqueleto óseo y branquias protegidas mediante un opérculo. A este grupo pertenecen la inmensa mayoría de las especies de peces.
Péptido señal	Extensión N-terminal de las proteínas recién sintetizadas reconocida por el sistema Sec o Ruta General de Secreción.
Pelágicos	El ambiente pelágico es el que está formado por las aguas libres que no están en contacto con el fondo. Esta masa de agua se ha compartimentado en sentido vertical y en sentido horizontal, donde, a su vez, se distinguen distintas zonas. A los peces que nadan en estas aguas se les conoce como pelágicos, y se caracterizan por tener fuertes músculos, con la aleta caudal más desarrollada que las dorsales y ventrales, lo que les permite desarrollar grandes velocidades cuando nadan ya que realizan migraciones en función de la estación del año, la temperatura del agua o la época de reproducción. Las especies de peces pelágicas son en general de carne grasa o semigrasa y algunos ejemplos son los atunes y las sardinas.
Pesca extractiva	Se considera pesca extractiva aquella actividad pesquera que tiene por objetivo capturar, cazar o recolectar recursos hidrobiológicos, tanto de forma industrial como artesanal. En este concepto no están incluidas la acuicultura ni la pesca deportiva.
Pescado graso	El pescado graso o también llamado pescado azul es aquel que su contenido graso supera, aproximadamente, el 6% de su peso.
Pescado semigraso	El pescado semigraso es aquel en el que su contenido graso se encuentra entre el 2,5 y 6% de su peso.
Pescado magro	El pescado magro también llamado pescado blanco es aquel en el que su contenido graso no supera, aproximadamente, el 2,5% de su peso.
Piocina	Bacteriocina producida por <i>Pseudomonas</i> spp.
Preprobacteriocina	Precursor de la bacteriocina biológicamente inactivo constituido por una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) y un propéptido C-terminal (probacteriocina).
Probacteriocina	Forma de la bacteriocina en la que, en su caso, se ha eliminado la extensión N-terminal implicada en su secreción, pero que aún no ha sufrido las modificaciones postraduccionales que darán lugar a la bacteriocina madura.
Proteína chaperona	Conjunto de proteínas presentes en todas las células cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas. Estas chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a otra parte de la célula donde la proteína realiza su función.
Replicón	Molécula de ADN capaz de replicarse independientemente. Región de ADN plasmídico (<3 kb) que incluye los genes y las secuencias necesarias para la replicación plasmídica y su control.

Respuesta SOS	Síntesis de una serie de proteínas implicadas en la reparación, recombinación y replicación del ADN que se produce en células bacterianas cuyo ADN ha sufrido graves daños (por ej.: exposición a luz ultravioleta).
Secuencia –10	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 10 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TATAAT.
Secuencia –35	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 35 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TTGACA.
Secuencia consenso	Segmento de un gen/proteína que es compartido por un gran número de miembros de una familia génica/proteica, cuya secuencia representa los residuos nucleotídicos/aminoácídicos encontrados más frecuentemente en cada posición (residuos conservados).
Sistema de secreción del tipo ABC	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder en el que participan una proteína transportadora del tipo ABC y una proteína accesoria, dedicados específicamente a la secreción de una sustancia determinada.
Sistema Sec	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo péptido señal en el que participan los productos de los genes Sec y las peptidasas señal encargadas del procesamiento del prepropéptido.
Stock	Es la fracción explotable de una población de un recurso hidrobiológico.
Traducción	Proceso de síntesis de una proteína a partir de una molécula de ARNm (que contiene la información genética necesaria para codificar una o varias proteínas mediante su traducción a producto génico en los ribosomas).
Transcripción	Proceso de síntesis de una molécula de ARNm a partir del ADN.
Transformación	Proceso de asimilación de moléculas de ADN por una célula bacteriana.
Transportador del tipo ABC	Homodímero de proteína(s) (aprox. 700 aa) que contiene: (i) un dominio C-terminal o de unión al ATP con actividad ATPasa, que contienen los motivos Walker A y Walker B, el motivo C y la región de cambio, y (ii) un dominio central integral de membrana, que contiene 4–6 segmentos transmembrana. En la mayoría de los transportadores del tipo ABC dedicados al transporte de bacteriocinas existe un dominio adicional o dominio N-terminal con actividad proteolítica, que contiene dos secuencias conservadas denominadas dominio cisteína y dominio histidina.
Transposón	Elemento genético móvil o secuencia de ADN con capacidad de desplazarse (transponerse) de un lugar del ADN a otro.
Unidad arbitraria	Unidad empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana empleando la prueba ADT que se define como “el recíproco de la máxima dilución de una muestra que inhibe al microorganismo indicador inoculado en una placa de agar produciendo la aparición de un halo o zona de inhibición”.

Unidad de bacteriocina Unidad empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana empleando la prueba MPA que se define como “el recíproco de la máxima dilución de una muestra que inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora”.

Vector Molécula de ADN de pequeño tamaño molecular con capacidad de replicarse, en la que se inserta un fragmento de ADN exógeno objeto de estudio (por ej.: plásmidos).

APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS

Capítulo II

Tabla II.1.	Clasificación de las especies acuícolas de interés pesquero según ISSCAAP	34
Tabla II.2.	Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo	36
Tabla II.3.	Lista de las áreas principales de pesca según la FAO	38
Tabla II.4.	Principales especies de pesca extractiva comercializadas en fresco	44
Tabla II.5.	Producción de las principales especies comerciales en la acuicultura marina	49
Tabla II.6.	Producción de las principales especies comerciales en la acuicultura continental	50
Tabla II.7.	Canales de comercialización de productos pesqueros en España	52
Tabla II.8.	Principales componentes (%) del músculo de pescado y de vacuno	56
Tabla II.9.	Clasificación de especies de pescado según su contenido graso	57
Tabla II.10.	Resumen de los cambios autolíticos producidos en el pescado	63
Tabla II.11.	Sustratos nitrogenados del pescado, MED y principales compuestos de la degradación bacteriana que determinan su calidad	66
Tabla II.12.	Ventajas e inconvenientes de la refrigeración y congelación del pescado.....	74
Tabla II.13.	Productos de pescado fermentado	78
Tabla II.14.	Esquema taxonómico del orden <i>Lactobacillales</i>	80
Tabla II.15.	Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos	83
Tabla II.16.	Características principales de los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por células procariotas y eucariotas	89
Tabla II.17.	Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos	91
Tabla II.18.	Características principales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram- negativas y Gram-positivas	95
Tabla II.19.	Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	99
Tabla II.20.	Especies y principales características taxonómicas del género <i>Lactobacillus</i>	142
Tabla II.21.	Especies del género <i>Lactobacillus</i> aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca	149

Tabla II.22.	Medicamentos y complementos alimenticios formulados con cepas del género <i>Lactobacillus</i> como principio activo comercializados en el mercado español.....	151
Tabla II.23.	Lista de bacterias lácticas con estatus QPS propuesta por la EFSA	155
Tabla II.24.	Preparaciones probióticas comerciales para la acuicultura con cepas del género <i>Lactobacillus</i> y otras bacterias lácticas en su composición	156
Tabla II.25.	Bacteriocinas producidas por cepas del género <i>Lactobacillus</i>	157

Capítulo III/Chapter III

Table III.1.	<i>Bacteriocinogenic LAB, indicator microorganisms and positive control strains used in this study</i>	182
Table III.2.	<i>Fish, seafood and fish products, and anatomic source used in this study</i>	184
Table III.3.	<i>Primers used in this study</i>	186
Table III.4.	<i>Microbial loads from fish, seafood and fish products, and percentages of LAB and enterococcal populations</i>	189
Table III.5.	<i>Antimicrobial activity of 197 LAB strains isolated from fish, seafood and fish products against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria</i>	225
Table III.6.	<i>Direct and extracellular antimicrobial and anti-Listeria activity of the 1,245 LAB isolated from fish, seafood and fish products</i>	191
Table III.7.	<i>Bacteriocin activity of the selected 64 LAB against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria</i>	231
Table III.8.	<i>Bacteriocin activity of the 25 bacteriocinogenic LAB against 20 Gram-positive and Gram-negative bacteria</i>	233
Table III.9.	<i>Biochemical tests and taxonomic identification of the selected 64 LAB isolates</i>	194
Table III.10.	<i>Enterocin genotype, virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of the 20 bacteriocinogenic Enterococcus faecium isolates</i>	202
Table III.11.	<i>Bacteriocin self- and cross-immunity of the 25 bacteriocinogenic LAB</i>	234

Capítulo IV/Chapter IV

Table IV.1.	<i>Bacteriocinogenic and indicator microorganisms used in this study</i>	243
Table IV.2.	<i>Oligonucleotide primers used for PCR and/or DNA sequencing</i>	244
Table IV.3.	<i>Extracellular antimicrobial activity of Lb. curvatus BCS35, Lb. sakei LTH673 and P. acidilactici 347 at different growth times.....</i>	249
Table IV.4.	<i>Extracellular antimicrobial activity of Lb. curvatus BCS35, Lb. sakei LTH673 and P. acidilactici 347 against Listeria spp. and LAB strains.....</i>	250
Table IV.5.	<i>Purification of CurG14 and CurG15 produced by Lb. curvatus BCS35, SakP produced by Lb. sakei LTH673 and PedPA-1 produced by P. acidilactici 347</i>	251
Table IV.6.	<i>Comparison of CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakT (SakT_α and SakT_β), and SakQ from Lb. curvatus BCS35 with other class II bacteriocins</i>	253

Table IV.7.	<i>Comparative specific antimicrobial activity of purified class IIa bacteriocins CurG14 (SakP variant), CurG15 (SakX), SakP and PedPA-1</i>	260
--------------------	--	-----

Table IV.8.	<i>Antibiotic susceptibility of Lb. curvatus BCS35</i>	261
--------------------	--	-----

Capítulo V/Chapter V

Table V.1.	<i>Lab-scale biopreservation strategies for fresh landed young hake (Merluccius merluccius) and megrim (Lepidorhombus boscii)</i>	285
-------------------	---	-----

Table V.2.	<i>Semi-industrial scale biopreservation strategies for fresh landed young hake (Merluccius merluccius) and megrim (Lepidorhombus boscii)</i>	287
-------------------	---	-----

Table V.3.	<i>Microbiological analysis of young hake (M. merluccius) during the lab-scale biopreservation trials</i>	291
-------------------	---	-----

Table V.4.	<i>Microbiological analysis of megrim (L. boscii) during the lab-scale biopreservation trials</i>	292
-------------------	---	-----

Table V.5.	<i>Microbiological analysis of young hake (M. merluccius) and megrim (L. boscii) during the semi-industrial biopreservation trials</i>	298
-------------------	--	-----

Table V.6.	<i>Sensory analysis of young hake (M. merluccius) and megrim (L. boscii) performed by a professional fish appraiser</i>	299
-------------------	---	-----

Capítulo VI/Chapter VI

Table VI.1.	<i>Bacterial strains and plasmids used in this study</i>	317
--------------------	--	-----

Table VI.2.	<i>Primers and PCR products used in this study</i>	319
--------------------	--	-----

Table VI.3.	<i>Antimicrobial activity of supernatants from Lc. lactis NZ9000 (pNUG14E) recombinant strains at different times after induction at an OD₆₀₀ of 0.5</i>	326
--------------------	---	-----

Table VI.4.	<i>Antimicrobial activity of supernatants from Lc. lactis NZ9000 (pNUG15E) recombinant strains at different times after induction at an OD₆₀₀ of 0.5</i>	326
--------------------	---	-----

Table VI.5.	<i>Purification of CurG14 and CurG15 produced by Lc. lactis NZ9000-69E (pNUG14E) and Lc. lactis NZ9000-12E (pNUG15E), respectively</i>	327
--------------------	--	-----

Table VI.6.	<i>Antimicrobial activity and production of CurG14 by Lc. lactis NZ9000-69E (pNUG14E)</i>	329
--------------------	---	-----

Table VI.7.	<i>Antimicrobial activity and production of CurG15 by Lc. lactis NZ9000-12E (pNUG15E)</i>	329
--------------------	---	-----

Table VI.8.	<i>Maximum bacterial growth, antimicrobial activity and bacteriocin production by Lb. curvatus BCS35 grown in MRS broth at different temperatures</i>	333
--------------------	---	-----

Capítulo VII

Tabla VII.1.	<i>Susceptibilidad a diversos antibióticos de las 20 cepas de E. faecium bacteriocinogénicas de origen marino</i>	366
---------------------	---	-----

Tabla VII.2.	<i>Alineamiento de la secuencia aminoacídica de CurG14 (variante de SakP), CurG15 (SakX), SakP y PedPA-1</i>	378
---------------------	--	-----

Tabla VII.3. Detección y cuantificación de la producción de CurG14 y CurG15 por cepas recombinantes de <i>Lc. lactis</i> NZ9000 y la cepa multibacteriocinogénica salvaje <i>Lb. curvatus</i> BCS35 mediante técnicas microbiológicas e inmunoquímicas	389
---	-----

APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 2.1. Anatomía externa de un pez.....	31
Figura 2.2. Áreas principales de pesca según la FAO	37
Figura 2.3. Composición de la producción acuícola mundial	42
Figura 2.4. Producción acuícola en España.....	48
Figura 2.5. Valor del producto comercializado (%) en España por Comunidades Autónomas	51
Figura 2.6. Factores que contribuyen a la calidad del pescado	54
Figura 2.7. Cambios organolépticos en la calidad del bacalao conservado en hielo	68
Figura 2.8. Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas: (i) formación de poros en la membrana, mediada o no por una molécula <i>docking</i> (1a y 1b, respectivamente); (ii) inhibición de la síntesis de la pared celular (2), e (iii) hidrólisis de la pared celular (3).....	105
Figura 2.9. Modelos que explican la formación de poros por las bacteriocinas	106
Figura 2.10. Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II	108
Figura 2.11. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram positivas (A) y Gram-negativas (B)	114
Figura 2.12. Representación esquemática de la topología de membrana de una peptidasa señal de tipo I de <i>B. subtilis</i> (A) y la Lep de <i>E. coli</i> (B)	117
Figura 2.13. Modelo de interacción del SP en la membrana citoplasmática y procesamiento por la peptidasa señal	118
Figura 2.14. Transporte y procesamiento de proteínas mediante la translocasa Sec	119
Figura 2.15. Esquema general de las rutas de fermentación de la glucosa por los lactobacilos y otras bacterias lácticas	141
Figura 2.16. Representación esquemática del <i>cluster</i> génico de la nisina A (NisA)	171
Figura 2.17. Representación esquemática del sistema NICE	171

Capítulo III/Chapter III

Figure 3.1. <i>Direct antimicrobial activity of selected LAB isolates against Sh. hanedai CECT5194 by a SOAT (A); and extracellular antimicrobial activity of selected LAB isolates against L. monocytogenes CECT936 by an ADT (B).</i>	190
Figure 3.2. <i>Isolation source (%) of the 197 isolates with direct antimicrobial activity</i>	192

Figure 3.3.	PCR-based identification of <i>Enterococcus</i> spp. amongst the 64 selected LAB isolates from squid, rainbow trout, seabass and cockle (A); cockle, octopus, sardine and cold-smoked Atlantic salmon (B); cold-smoked, marinated and fresh Atlantic salmon and albacore (C); and Norway lobster and dry-salted cod (D)	197
Figure 3.4.	Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of <i>Lactobacillus sakei</i> sakei B11, <i>Lactobacillus curvatus</i> curvatus BCS35, and <i>Lactobacillus sakei</i> carnosus SMA17 and SMM73	198
Figure 3.5.	Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of <i>Pediococcus pentosaceus</i> LPV57	199
Figure 3.6.	Dendrogram of the digitalized electrophoregram derived from the unweighted-pair group method using average linkage of correlation coefficients between whole-cell protein patterns of <i>Enterococcus faecium</i> LPP29 and SMF4	200
Figure 3.7.	Incidence of combinations of enterocin genes (%) amongst the 10 bacteriocinogenic <i>E. faecium</i> strains isolated from fish, seafood and fish products.....	203

Capítulo IV/Chapter IV

Figure 4.1.	PCR detection of <i>sppA</i> with primers pairs SakP1-SakP3 (A) and SakP2-SakP3 (B), <i>sppQ</i> with primers pairs SakQF-SakQR (C), and <i>curA</i> with primers pairs CurA1-CurA3 (D) and CurA2-CurA3 (E) in <i>Lactobacillus</i> spp. strains of marine origin.....	248
Figure 4.2.	Mass spectrometry analysis of purified CurG14 (SakP variant) (A) and CurG15 (SakX) (B) from <i>Lb. curvatus</i> BCS35, SakP from <i>Lb. sakei</i> LTH673 (C), and PedPA-1 from <i>P. acidilactici</i> 347 (D).....	252
Figure 4.3.	Nucleotide sequence of a 1,182-bp fragment from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 containing the structural gene of curvacin G14 (SakP variant) (<i>sppA</i>), the putative immunity gene (<i>spiA</i>), and a fragment of the gene encoding the response regulator protein (<i>sppR</i>)	254
Figure 4.4.	Genetic organization of the 1,182-bp nucleotide region from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 containing curvacin G14 (SakP variant) structural (<i>sppA</i>) and immunity (<i>spiA</i>) genes, and a fragment of the gene encoding a response regulator protein (<i>sppR</i>)	255
Figure 4.5.	Nucleotide sequence of a 1,743-bp fragment from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 containing the structural genes of sakacin T (<i>sakT_α</i> and <i>sakT_β</i>) and sakacin X (<i>sakX</i>) and their putative immunity genes (<i>sakI_T</i> and <i>sakI_X</i> , respectively)	256
Figure 4.6.	Genetic organization of the 1,743-bp nucleotide region from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 containing sakacin T (<i>SakT_α</i> and <i>SakT_β</i>) structural (<i>sakT_α</i> and <i>sakT_β</i>) and immunity (<i>sakIT</i>) genes, sakacin X structural (<i>sakX</i>) and immunity (<i>sakI_X</i>) genes, and <i>orf6</i>	258
Figure 4.7.	Nucleotide sequence of the opposite strand of the 1,743-bp fragment from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 encoding a putative 120 amino acid protein (<i>orf6</i>)	258
Figure 4.8.	Nucleotide sequence of a 189-bp fragment from <i>Lb. curvatus</i> BCS35 containing the structural gene of sakacin Q (<i>sppQ</i>).....	259

Capítulo V/Chapter V

Figure 5.1.	<i>Biopreservation of young hake (M. merluccius) at lab-scale</i>	286
Figure 5.2.	<i>Biopreservation of megrim (L. bosci) at lab-scale</i>	286
Figure 5.3.	<i>Biopreservation of young hake (M. merluccius) at semi-industrial scale</i>	287
Figure 5.4.	<i>Biopreservation of megrim (L. bosci) at semi-industrial scale</i>	288
Figure 5.5.	<i>Sensory evaluation of young hake (M. merluccius) during the lab-scale biopreservation trials</i>	293
Figure 5.5.	<i>Sensory evaluation of megrim (L. bosci) during the lab-scale biopreservation trials</i>	295

Capítulo VI/Chapter VI

Figure 6.1.	<i>Construction strategy of the recombinant plasmids pNUG14E, pNUG15E, pNUG14EI and pNUG15EI, derived from pNZ8048</i>	320
Figure 6.2.	<i>Mass spectrometry analysis of purified CurG14 (A) and CurG15 (B) from Lc. lactis NZ9000-69E (pNUG14E) and Lc. lactis NZ9000-12E (pNUG15E), respectively</i>	328
Figure 6.3.	<i>Bacterial growth (OD₆₀₀) (MRS broth and GM17 broth), and antimicrobial activity (BU/ml) (MRS broth and GM17 broth) of Lb. curvatus BCS35 grown at 30°C</i>	330
Figure 6.4.	<i>Bacterial growth (OD₆₀₀), antimicrobial activity (BU/ml) and concentration (ng/ml) of CurG14 and CurG15 in supernatants from Lb. curvatus BCS35 grown in MRS broth at 37 (A), 30 (B), 25 (C), 18 (D), 8 (E) and 4°C (F)</i>	331

Capítulo VII

Figura 7.1.	<i>Composición microbiana de las muestras de moluscos</i>	353
Figura 7.2.	<i>Composición microbiana de las muestras de pescados de acuicultura</i>	353
Figura 7.3.	<i>Composición microbiana de las muestras de crustáceos</i>	354
Figura 7.4.	<i>Composición microbiana de las muestras de pescados de agua salada y pesca extractiva</i>	355
Figura 7.5.	<i>Composición microbiana de las muestras de productos de la pesca listos para el consumo</i>	356
Figura 7.6.	<i>Géneros de bacterias lácticas (%) identificados entre las 64 cepas con actividad antimicrobiana de origen marino</i>	358
Figura 7.7.	<i>Especies de bacterias lácticas (%) identificadas entre las 64 cepas con actividad antimicrobiana de origen marino</i>	360
Figura 7.8.	<i>Especies de bacterias lácticas (%) identificadas entre las 25 cepas bacteriocinogénicas de origen marino</i>	362
Figura 7.9.	<i>Incidencia (%) de genes de enterocinas en las 20 cepas de E. faecium bacteriocinogénicas de origen marino</i>	364
Figura 7.10.	<i>Estructura y orientación en la membrana de bacteriocinas de la clase IIa</i>	376
Figura 7.11.	<i>Modelo de interacción de SakP (A) y CurG14 (B) con la membrana de la célula diana</i>	378
Figura 7.12.	<i>Mapa de las zonas ICES</i>	380